

**ANALYSE DE L'EXPRESSION DU GÈNE ZPK DANS LA LIGNÉE  
DE CELLULES P19 ET PRODUCTION D'UN ANTICORPS**

par

Nathalie Daigle

mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

**FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

Sherbrooke, Québec, Canada, Octobre 1997



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-35665-5



Le 16 mars 199<sup>8</sup>, le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.

Président-rapporteur: M. Adrien R. Beaudoin \_\_\_\_\_  
Département de biologie

Membre: M. Richard Blouin \_\_\_\_\_  
Département de biologie

Membre: M. Brian Talbot \_\_\_\_\_  
Département de biologie

## SOMMAIRE

ZPK est une nouvelle protéine sérine/thréonine kinase cytosolique contenant des motifs structuraux analogues à ceux présents chez les membres de la famille des "mixed-lineage kinases". La protéine kinase ZPK semble être impliquée dans les processus de contrôle de prolifération et de différenciation cellulaire. Dans le but de confirmer la relation possible entre ZPK et la différenciation cellulaire, l'expression de ce gène a été analysée dans la lignée de cellules P19. Ces cellules, lorsque traitées avec une concentration de  $10^{-6}$  M d'acide rétinoïque, se différencient en cellules de type neuronal. Ainsi, le niveau d'expression a été étudié avant et après l'induction de la différenciation cellulaire. Une analyse par Northern blot a pu montrer que les cellules P19 non-différenciées contiennent un niveau très faible d'ARNm de ZPK ; par contre, lorsque ces cellules se différencient en cellules de type neuronal en présence d'acide rétinoïque, ce niveau d'expression augmente de façon drastique. De plus, on a pu déterminer par une analyse de la stabilité de l'ARNm de ZPK et par une expérience de transcription nucléaire que l'augmentation du niveau d'ARNm est reliée à une régulation transcriptionnelle et non post-transcriptionnelle.

D'autre part, dans l'optique d'élargir les possibilités d'investiguer le rôle de la protéine kinase ZPK, un anticorps anti-ZPK a été produit chez le lapin. Pour ce faire, une protéine de fusion bactérienne, contenant un portion du domaine carboxy-terminal de ZPK, fut construite et injectée à des lapins. Les premières analyses visant à caractériser l'anticorps, effectuées par immunobuvardage, ont pu montrer que cet anti-ZPK reconnaît bel et bien la protéine kinase ZPK. Cet outil de travail va permettre la réalisation de nouvelles expériences pour l'étude de la fonction de cette protéine kinase.

## **REMERCIEMENTS**

Je voudrais remercier les docteurs Adrien Beaudoin et Brian Talbot, mes deux conseillers, pour le support et les conseils qu'ils m'ont donnés tout au long de mes deux années de recherche.

J'aimerais aussi dire merci à mes deux collègues de travail, Pascal Bergeron et Mélanie Douziech, pour l'aide qu'ils m'ont apportée et pour les nombreux bons moments passés ensemble dans le laboratoire.

Finalement, je voudrais adresser un merci tout particulier au docteur Richard Blouin, mon directeur de recherche, pour sa grande disponibilité, son sens de l'exactitude, son support financier, et aussi pour la confiance qu'il m'a témoigné durant mes deux années de maîtrise.

## TABLE DES MATIÈRES

|  |      |
|--|------|
| SOMMAIRE .....   | ii   |
| REMERCIEMENTS.....   | iii  |
| TABLE DES MATIÈRES .....                                     | iv   |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS.....                                  | vi   |
| LISTE DES FIGURES .....                                      | viii |
| LISTE DES TABLEAUX.....                                      | x    |
| CHAPITRE 1 - INTRODUCTION.....                               | 1    |
| 1.1 Les protéines kinases.....                               | 2    |
| 1.2 Les domaines SH2 et SH3 .....                            | 6    |
| 1.3 La famille MAPK .....                                    | 9    |
| 1.4 La famille MLK.....                                      | 13   |
| 1.5 Le domaine leucine-zipper.....                           | 14   |
| 1.6 ZPK/DLK/MUK .....  | 15   |
| 1.7 Fonction de ZPK/DLK/MUK .....                            | 18   |
| 1.8 Description du projet de maîtrise .....                  | 21   |
| CHAPITRE 2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....                       | 24   |
| 2.1 Culture cellulaire .....                                 | 24   |
| 2.2 Induction de la différenciation cellulaire.....          | 24   |
| 2.3 Extraction d'ARN total et Analyse de type Northern ..... | 24   |
| 2.3.1 Hybridation .....                                      | 25   |
| 2.3.2 Préparation de la sonde.....                           | 25   |
| 2.3.3 Lavage .....   | 26   |

|  |    |
|--|----|
| 2.4 Stabilité de l'ARNm .....  | 26 |
| 2.5 Transcription nucléaire .....  | 27 |
| 2.6 Construction et production d'une protéine de fusion.....                     | 27 |
| 2.7 Extraction et purification .....   | 28 |
| 2.8 Concentration de la protéine de fusion.....                                  | 29 |
| 2.9 Production d'un anticorps anti-ZPK .....                                     | 29 |
| 2.10 Analyse de type Western sur la protéine de fusion.....                      | 30 |
| 2.11 Analyse de type Western sur la protéine ZPK traduite <i>in vitro</i> .....  | 31 |
| CHAPITRE 3 - RESULTATS .....   | 33 |
| 3.1 Culture de la lignée de cellules P19.....                                    | 33 |
| 3.2 Expression du gène ZPK dans les cellules P19 .....                           | 37 |
| 3.3 Analyse de la stabilité de l'ARNm ZPK.....                                   | 40 |
| 3.4 Transcription nucléaire du gène ZPK .....                                    | 42 |
| 3.5 Production et purification d'une protéine de fusion.....                     | 42 |
| 3.6 Production d'un anticorps anti-ZPK .....                                     | 45 |
| 3.6.1 Analyse de type Western sur la protéine de fusion.....                     | 45 |
| 3.6.2 Analyse de type Western sur la protéine ZPK traduite <i>in vitro</i> ..... | 47 |
| CHAPITRE 4 - DISCUSSION .....  | 50 |
| 4.1 Expression de ZPK dans les cellules P19.....                                 | 50 |
| 4.2 Production d'un anticorps.....   | 55 |
| 4.3 Utilisation de l'anticorps dans la poursuite immédiate du projet .....       | 57 |
| 4.4 Perspectives d'avenir .....  | 58 |
| 4.5 Utilisation de l'anticorps pour la réalisation de diverses expériences.....  | 60 |
| CONCLUSION .....   | 62 |
| ANNEXE .....   | 63 |
| BIBLIOGRAPHIE.....   | 64 |

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

### Unité de mesure :

|       |                   |
|-------|-------------------|
| mA :  | milliampère       |
| M :   | molaire           |
| mM :  | millimolaire      |
| µg :  | microgramme       |
| mg :  | milligramme       |
| g :   | gramme            |
| µl :  | microlitre        |
| ml :  | millilitre        |
| cm :  | centimètre        |
| KDa : | kilodalton        |
| PM :  | poids moléculaire |

### Divers :

|         |  |
|---------|--|
| ADN :   | acide désoxyribonucléique                    |
| ADNc :  | ADN complémentaire                           |
| ARN :   | acide ribonucléique                          |
| ARNm :  | ARN messenger                                |
| ATP :   | adénosine triphosphate                       |
| DTT :   | dithiothreitol                               |
| EC :    | « embryonal carcinoma »                      |
| EGF :   | « epidermal growth factor »                  |
| GAPDH : | « glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase » |
| GTP :   | guanosine triphosphate                       |
| IPTG :  | « isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside »      |

|                |                                      |
|----------------|--------------------------------------|
| JNK :          | « Jun nuclear kinase »               |
| LB :           | Luria-Bertani                        |
| MAPK :         | « mitogen-activated protein kinase » |
| MLK :          | « mixed lineage kinase »             |
| NGF :          | « nerve growth factor »              |
| PDGF :         | « platelet-derived growth factor »   |
| PVDF :         | « poly-vinylidene-difluoride »       |
| SAPK :         | « stress-activated protein kinase »  |
| SH2 :          | « Src homology 2 »                   |
| SH3 :          | « Src homology 3 »                   |
| TNF $\alpha$ : | « tumor necrosis factor $\alpha$ »   |

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

|    |  |    |
|----|--|----|
| 1. | Représentation schématique des processus de prolifération, détermination et différenciation cellulaire. ....   | 1  |
| 2. | Représentation de la structure tridimensionnelle du domaine kinase. ....   | 3  |
| 3. | Localisation cellulaire des quatre groupes de protéines impliquées dans les cascades de transduction de signaux. ....  | 5  |
| 4. | Recrutement de molécules de transduction de signaux en réponse à l'activation d'un récepteur tyrosine kinase. ....   | 8  |
| 5. | Présentation d'un modèle d'interaction entre protéines qui implique des domaines SH2 et SH3 et qui est relié à l'activation d'une voie de transduction. .... | 9  |
| 6. | Présentation d'un arrangement parallèle possible des trois cascades de transduction de signaux. ....   | 11 |
| 7. | Représentation schématique de la disposition des leucines en septième position dans un domaine leucine-zipper. ....  | 14 |
| 8. | Représentation schématique de la formation d'une interaction entre deux domaines leucine-zipper. ....  | 15 |
| 9. | Comparaison des séquences d'acide aminé de ZPK murin et humain. ....   | 16 |



|     |  |    |
|-----|--|----|
| 10. | Représentation schématique de la structure primaire de ZPK murin. .... | 17 |
|-----|--|----|

## RÉSULTATS

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 11. | Relation entre la concentration d'acide rétinoïque et la différenciation<br>en cellules de type neuronal. ....                     | 33 |
| 12. | Relation entre la durée d'exposition des agrégats à l'acide rétinoïque et<br>la différenciation en cellules de type neuronal. .... | 34 |
| 13. | Photomicrographie en contraste de phase des cellules P19. ....   | 35 |
| 14. | Analyse de type Northern de l'expression du gène ZPK dans les cellules P19. ....   | 37 |
| 15. | Analyse quantitative des niveaux relatifs d'ARNm de ZPK. ....  | 38 |
| 16. | Analyse de la stabilité de l'ARNm ZPK dans les cellules P19. ....  | 40 |
| 17. | Transcription nucléaire du gène ZPK dans les cellules P19. ....  | 41 |
| 18. | Construction d'une protéine de fusion bactérienne. ....  | 43 |
| 19. | Analyse sur gel SDS-PAGE de la protéine de fusion bactérienne ZPK-(His) <sub>6</sub> . ....  | 45 |
| 20. | Analyse de type Western avec l'anticorps anti-ZPK sur la protéine de fusion<br>ZPK-(His) <sub>6</sub> . ....                       | 46 |
| 21. | Analyse de type Western avec l'anticorps anti-ZPK sur la protéine ZPK traduite<br><i>in vitro</i> ....                             | 48 |

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **ANNEXE**

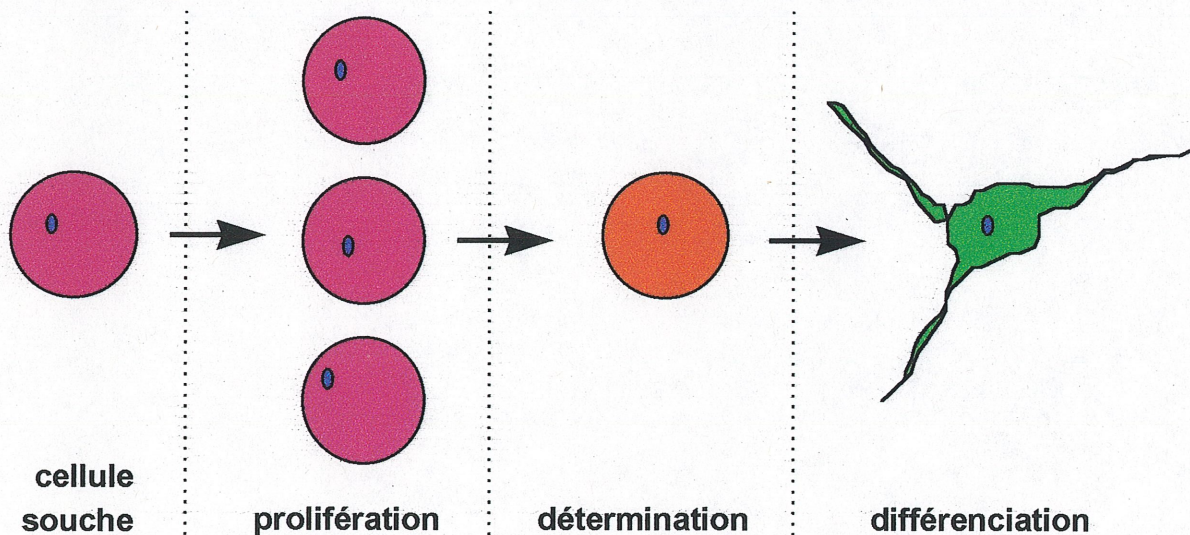
1. Les acides aminés et leurs symboles .....61

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

L'être humain est un organisme pluricellulaire complexe composé de cellules différenciées agencées selon un schéma bien précis. Au cours du développement embryonnaire, les différents types cellulaires se déterminent chacun à un endroit défini. En période de croissance, les cellules prolifèrent et conservent, dans la plupart des cas, leur spécialisation. Et même lorsque que la croissance est terminée, la prolifération cellulaire continue. En effet, dans les tissus adultes, de nouvelles cellules naissent constamment.

La prolifération et la différenciation sont deux processus cellulaires grandement étudiés en recherche. Lorsqu'on parle de différenciation, on pense aussi à détermination cellulaire. En fait, on dit d'une cellule qui a fait son choix de développement qu'elle est déterminée. Mais ici il faut faire attention, car en biologie, détermination n'égale pas nécessairement différenciation (voir figure1).



**Figure 1 : Représentation schématique des processus de prolifération, détermination et différenciation cellulaire.** Rose : cellule non différenciée, Orange : cellule déterminée, Vert : cellule différenciée.



Une cellule est déterminée au moment où elle a subi un changement autoreproductif d'une caractéristique interne qui la distingue, ainsi que ses descendantes, des autres cellules de l'embryon et qui engage cette descendance dans une voie de développement spécialisée. Le terme différenciation, quant à lui, est généralement réservé à la spécialisation du phénotype cellulaire qui est facilement décelable. Habituellement, une cellule devient déterminée avant de se différencier, bien que dans certains cas, les deux mécanismes se produisent simultanément (Alberts et al., 1995).

Les processus de prolifération et d'acquisition progressive d'un phénotype spécialisé démontrent un degré remarquable de coordination. Ceci implique une grande communication intercellulaire et ne relève donc pas entièrement d'une programmation intracellulaire. L'interaction des cellules avec les molécules adhésives de la matrice extracellulaire et des cellules entre elles par les jonctions serrées ou par des signaux diffusibles joue donc un rôle essentiel dans l'organogenèse. Parmi ces signaux diffusibles, les facteurs de croissance, facteurs polypeptidiques, ont un rôle central pour réguler par un mécanisme autocrine ou paracrine la croissance et la différenciation cellulaire (Evain-Brion, 1988).

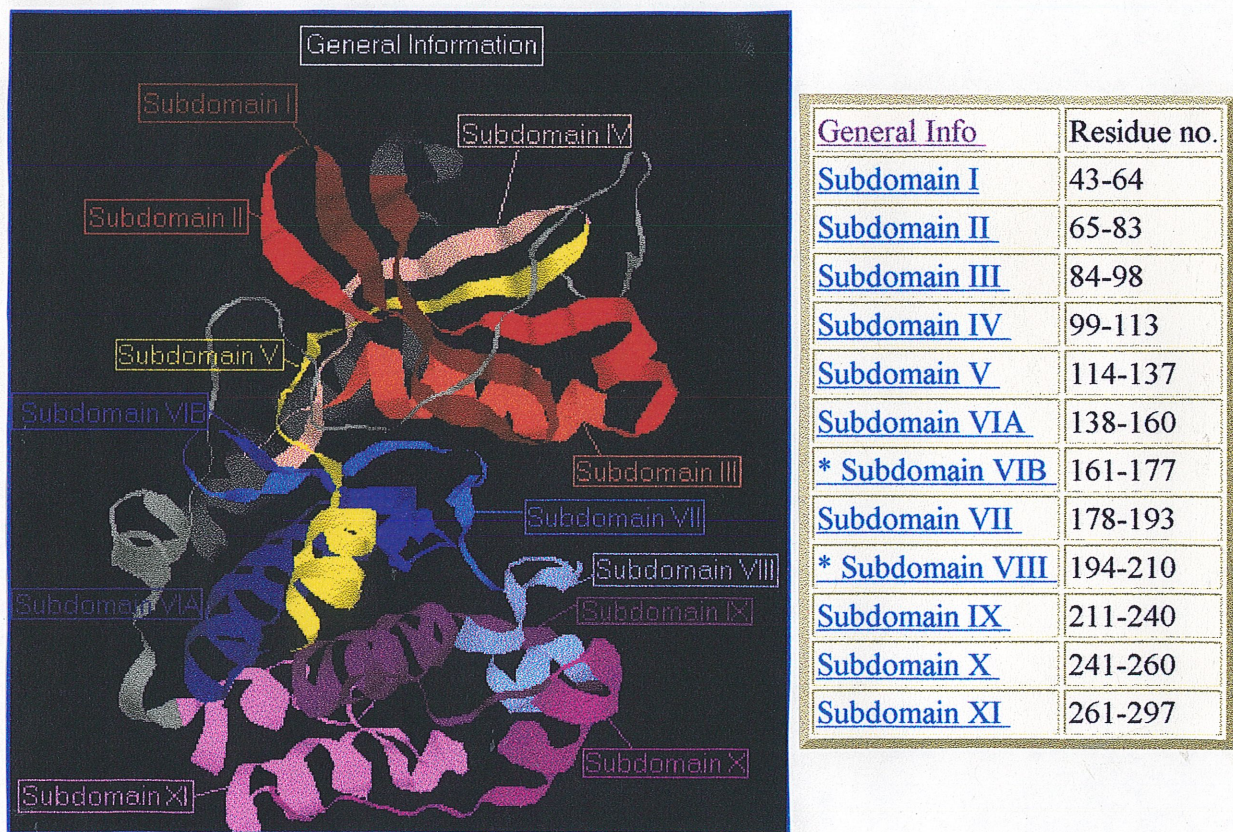
L'engagement d'une cellule vers la différenciation est la conséquence de gènes qui sont exprimés de façon sélective et dont les produits vont permettre à cette cellule d'exprimer un phénotype distinct. La différenciation constitue souvent l'étape finale du développement cellulaire (Darnell et al., 1993). En général, les caractéristiques d'une cellule sont régies par la combinaison de protéines régulatrices qu'elle contient. Celles-ci contrôlent son profil d'expression génique. Plusieurs groupes de protéines sont impliqués, de près ou de loin, dans cette régulation d'expression. Les protéines kinases en sont un bon exemple.

### **1.1 Les protéines kinases**

Les protéines kinases forment une des plus grandes familles de protéines et gènes homologues. Jusqu'à maintenant, on connaît la séquence de plus de 400 membres différents.



On peut retrouver dans cette superfamille une grande diversité de structure, mode de régulation et spécificité de substrats. Mais ce qui demeure commun à tous ces membres, c'est la présence d'un domaine kinase (ou domaine catalytique) qui consiste en 250-300 acides aminés (Hanks et Hunter, 1995) correspondant à environ 30 KDa (Hanks et al., 1988). On trouve, dans ce domaine, 12 sous-domaines conservés qui forment une structure catalytique centrale et commune pour toutes les protéines kinases. On peut visualiser ce domaine kinase dans la structure tridimensionnelle de plusieurs de ces protéines (Hanks et Hunter, 1995) (voir figure 2).



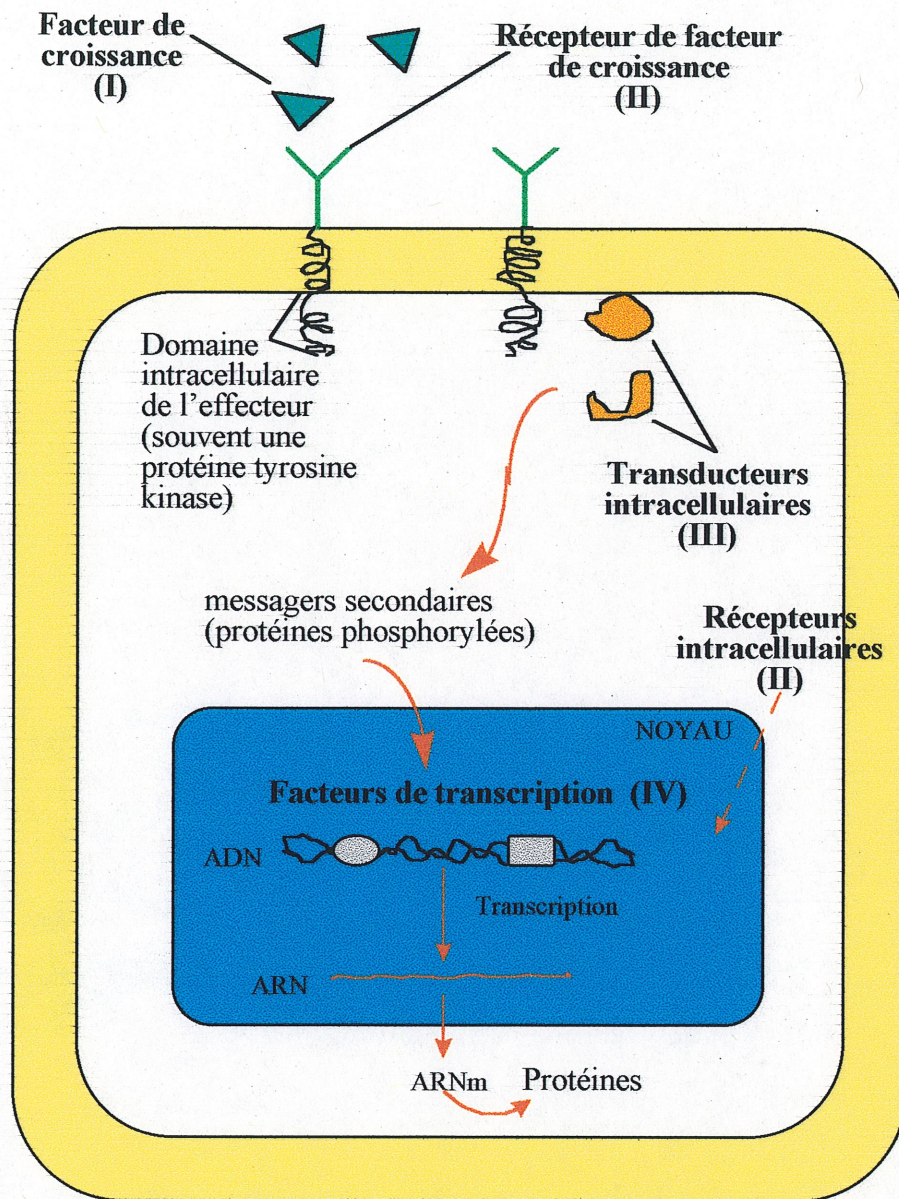
**Figure 2 : Représentation de la structure tridimensionnelle du domaine kinase.** On peut observer l'arrangement des 12 sous-domaines I à XI de la protéine kinase A (<http://WWW.sdsc.edu/kinases/pkr/3D/Xray/2cpk/2cpkwalk.html/>).



C'est donc ce domaine qui donne aux protéines kinases leur activité catalytique et qui leur permet d'exercer leurs rôles : liaison et orientation d'une molécule d'ATP (ou GTP) donneur, liaison et orientation d'une protéine substrat et transfert d'un  $\gamma$ -phosphate de la molécule d'ATP vers le groupement hydroxyl accepteur d'un résidu spécifique (Ser, Thr, ou Tyr) de la protéine substrat. La plupart des protéines kinases sont classées dans deux groupes principaux, soit les sérine/thréonine kinases ou les tyrosine kinases. Ce classement se fait selon leur structure primaire et leur spécificité pour l'acide aminé accepteur (Hanks et Hunter, 1995). La spécificité de phosphorylation pour un résidu tyrosine ou sérine/thréonine peut être prédite en regardant la séquence de deux motifs (Vib et VIII) dans lesquels des résidus différents sont conservés dans chaque classe. Récemment, la découverte de plusieurs protéines kinases avec à la fois une spécificité pour les résidus Tyr et Ser/Thr a été rapportée (Dorow et al., 1993). Mais ces protéines, qui possèdent une double spécificité, ne forment pas un groupe distinct.

Les protéines kinases se retrouvent souvent, soit à titre de récepteur ou de protéine intracellulaire, dans les cascades de transduction de signaux impliquées dans le contrôle de la division et la différenciation cellulaire (voir figure 3). On a qu'à penser aux nombreux récepteurs tyrosine kinases qui lient des facteurs de croissance comme le EGF et le PDGF ou encore, aux protéines kinases qui forment les voies MAPKs (mitogen-activated protein kinases) et qui représentent une grande famille de protéines intracellulaires reconnues pour leur implication dans ces processus cellulaires. Par exemple, il a été démontré, dans les cellules neuronales PC12, que selon le contexte cellulaire, l'activation de la protéine kinase MAPKK1 est nécessaire et suffisante pour mener à la différenciation ou à la prolifération cellulaire (Cowley et al., 1994). Les cascades de transduction de signaux amènent, au niveau du noyau, un contrôle sur la transcription des gènes. Par conséquent, la décision de progresser dans le cycle cellulaire ou de s'arrêter en  $G_1$  pour se diriger vers la différenciation va dépendre du signal reçu à la surface de la cellule qui va conduire à la transcription de tel ou tel gène.





**Figure 3 : Localisation cellulaire des quatre groupes de protéines impliquées dans les cascades de transduction de signaux.** Ces différents groupes sont les facteurs de croissance (I), les récepteurs (II), les transducteurs (III) et les facteurs de transcription (IV) (Darnell et al., 1993).

Ainsi, un grand nombre de protéines tyrosine kinases servent de récepteurs pour une variété de polypeptides circulants et les cascades de transduction de signaux, qui régulent les réponses, utilisent souvent des réactions séquentielles de protéines kinases intracellulaires: une kinase, activée par la liaison d'un facteur peptidique sur son récepteur spécifique, va phosphoryler et activer la prochaine kinase dans la voie et ainsi de suite jusqu'au noyau (Johnson et Vaillancourt, 1994). Un même récepteur peut, dépendant où il est exprimé, conduire à la prolifération ou la différenciation cellulaire. Par exemple, le récepteur du facteur de croissance FGF signale la différenciation dans les cellules neuronales PC12 alors qu'il stimule la prolifération dans les fibroblastes. Ces observations démontrent l'importance du contexte cellulaire dans l'étude des cascades de transduction de signaux (Marshall, 1995).

Une approche souvent utilisée pour étudier et démontrer l'implication de protéines kinases dans le processus de différenciation, est celle de la transfection et de l'établissement de transfectants stables dans diverses lignées de cellules qui peuvent se différencier. Par exemple, la transfection et la surexpression de la  $\xi$ -protéine kinase C stimule la différenciation des cellules U-937 (Ways et al., 1994); tandis que la  $\varepsilon$ -protéine kinase C, lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules PC12, favorise la croissance des neurites (différenciation) (Hundle et al., 1995). La protéine kinase CLK, qui possède une double spécificité, induit aussi la différenciation neuronale dans les cellules PC12 lorsqu'elle y est surexprimée. En fait, cette protéine mime un certain nombre d'événements qui sont NGF-dépendant, comme la différenciation morphologique et l'élaboration de neurites, suggérant que l'expression de CLK et le traitement au NGF activent une voie de transduction similaire dans les cellules PC12 (Myers et al., 1994).

## **1.2 Les domaines SH2 et SH3**

La façon dont les récepteurs tyrosine kinases sélectionnent leurs cibles pour stimuler une voie intracellulaire spécifique a été élucidée par l'identification d'un module protéique conservé soit le domaine d'homologie Src 2 (SH2). Celui-ci contient environ 100 acides aminés et se

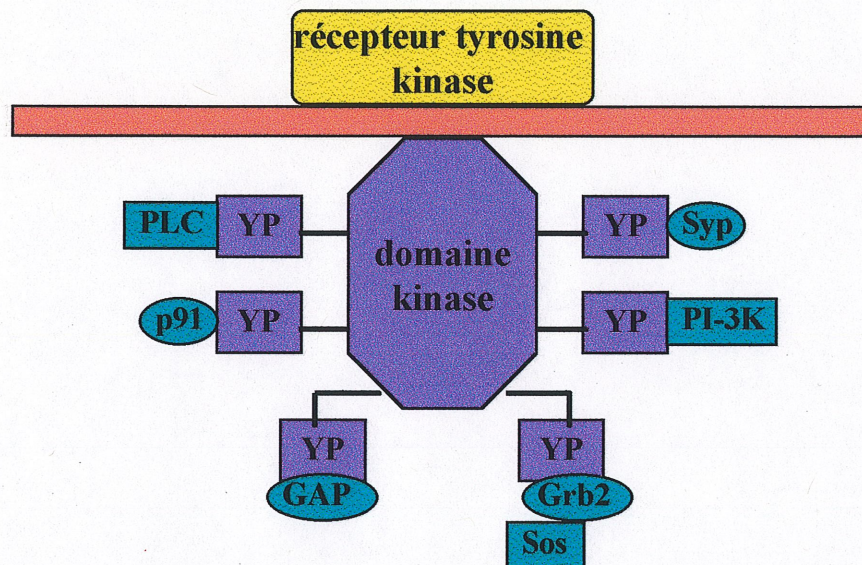


retrouve grandement dans les divers groupes de protéines cytoplasmiques impliquées dans la transduction de signaux. Ce domaine joue un rôle majeur dans les interactions entre les récepteurs tyrosine kinases et les protéines intracellulaires. Comment tout cela fonctionne ? Lorsqu'un ligand extracellulaire se lie sur son récepteur respectif, il provoque sa dimérisation. Ceci a pour effet de déclencher une autophosphorylation sur un résidu tyrosine spécifique et de créer un site de liaison pour le domaine SH2 des protéines de transduction de signaux cytoplasmiques qui deviennent alors une cible pour l'activation. Le domaine SH2 reconnaît directement la tyrosine phosphorylée (Pawson et Gish, 1992).

Cependant, le haut degré d'affinité de liaison d'un domaine SH2 demande que la tyrosine phosphorylée soit entourée par une séquence d'acide aminé bien spécifique. Par exemple, la protéine phosphatidylinositol (PI) 3' kinase, la protéine Ras GTPase activatrice et la phospholipase C- $\gamma$  contiennent toutes un domaine SH2 mais chacune va lier un site autophosphorylé différent sur le récepteur  $\beta$  du PDGF (Pawson et Gish, 1992). Le recrutement par le résidu tyrosine phosphorylé d'un récepteur mène à l'activation de molécules signaux par une variété de mécanismes : 1) phosphorylation de tyrosines dans le cas de la phospholipase C- $\gamma$  et des STATs (signal transducers and activators of transcription) 2) changement de conformation induit par la liaison du domaine SH2 à la phosphotyrosine pour PI3 kinases et SH-PTP2 tyrosine phosphatase 3) translocation à la membrane plasmique pour la stimulation de l'échange du nucléotide guanine sur Ras par le facteur Sos (Marshall, 1995) (voir figure 4).

Les protéines qui contiennent un domaine SH2 vont souvent posséder une séquence distincte d'environ 50 résidus nommée domaine d'homologie Src 3 (SH3). Comme par exemple : la phospholipase C- $\gamma$ , la sous-unité p85 de la PI3 kinase, GAP (GTPase-activating protein) et Grb2 (qui est une protéine adaptateur) sont toutes des protéines qui contiennent à la fois un domaine SH2 et SH3. Le domaine SH3 est aussi impliqué dans la régulation des interactions protéine-protéine qui surviennent durant la transduction de signaux. Ce domaine reconnaît des motifs proline-riche et permet ainsi une liaison spécifique entre deux protéines

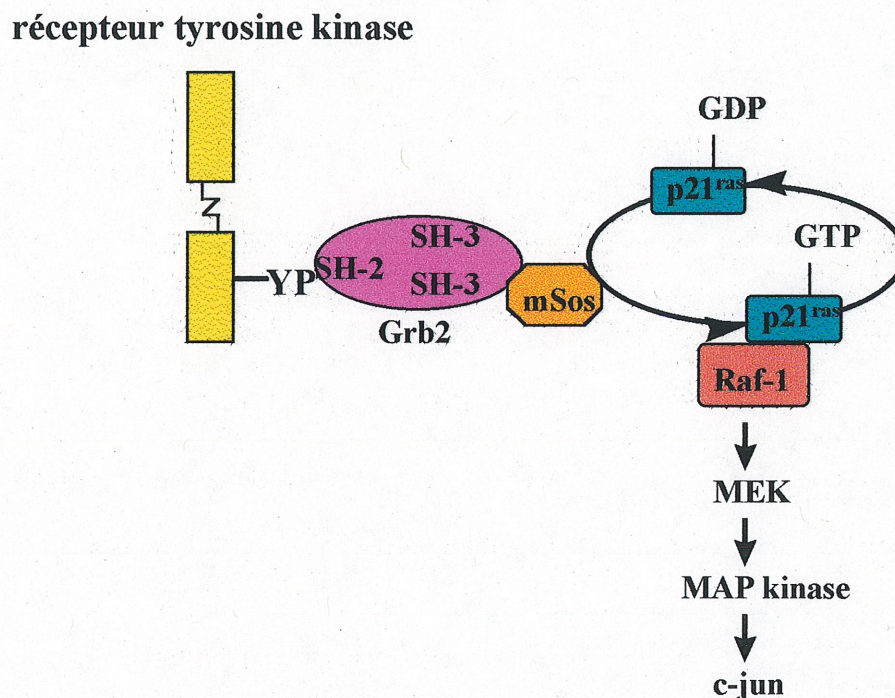
possédant des fonctions régulatrices (Pawson et Gish, 1992). Voici un modèle très connu d'interactions entre protéines qui font appel à des domaines SH2 et SH3 : la protéine adaptateur Grb2 lie la tyrosine phosphorylée d'un récepteur de facteur de croissance, comme celui du EGF ou du PDGF, par son domaine SH2. Sos, qui est le facteur d'échange de nucléotide guanine de la protéine Ras, se lie à Grb2 via le domaine SH3 de Grb2. Le complexe protéique



**Figure 4 : Recrutement de molécules de transduction de signaux en réponse à l'activation d'un récepteur tyrosine kinase.** Les protéines contenant un domaine SH2 sont recrutées par une phosphotyrosine spécifique du récepteur et servent de signal pour l'activation séquentielle de protéines intracellulaires. Les activations de PLC $\gamma$ , p91 (un facteur de transcription), GAP (GTPase-activating protein), Grb2/Sos, PI-3K et Syp (une tyrosine phosphatase) sont illustrées (Johnson et Vaillancourt, 1994).



Grb2/Sos est amené vers le récepteur à la surface de la membrane plasmique où l'interaction de Sos avec Ras-GDP catalyse la dissociation de GDP et Ras permettant l'approche de GTP pour la formation d'un complexe Ras-GTP activé (Johnson et Vaillancourt, 1994). Une fois activé, ce complexe pourra interagir avec d'autres protéines qui se retrouvent en aval d'une voie de transduction, comme Raf, et les activer (voir figure 5).



**Figure 5 : Présentation d'un modèle d'interaction entre protéines qui implique des domaines SH2 et SH3, et qui est relié à l'activation d'une voie de transduction (Malarkey et al., 1995).**

### 1.3 La famille MAPK

Les MAPKs (mitogen-activated protein kinases) sont des exemples de protéines kinases intracellulaires impliquées dans les processus de contrôle de la prolifération et différenciation d'une variété de types cellulaires. Cette grande famille de protéines comprend d'importants médiateurs de transduction de signaux de la surface de la cellule jusqu'au noyau. Les voies



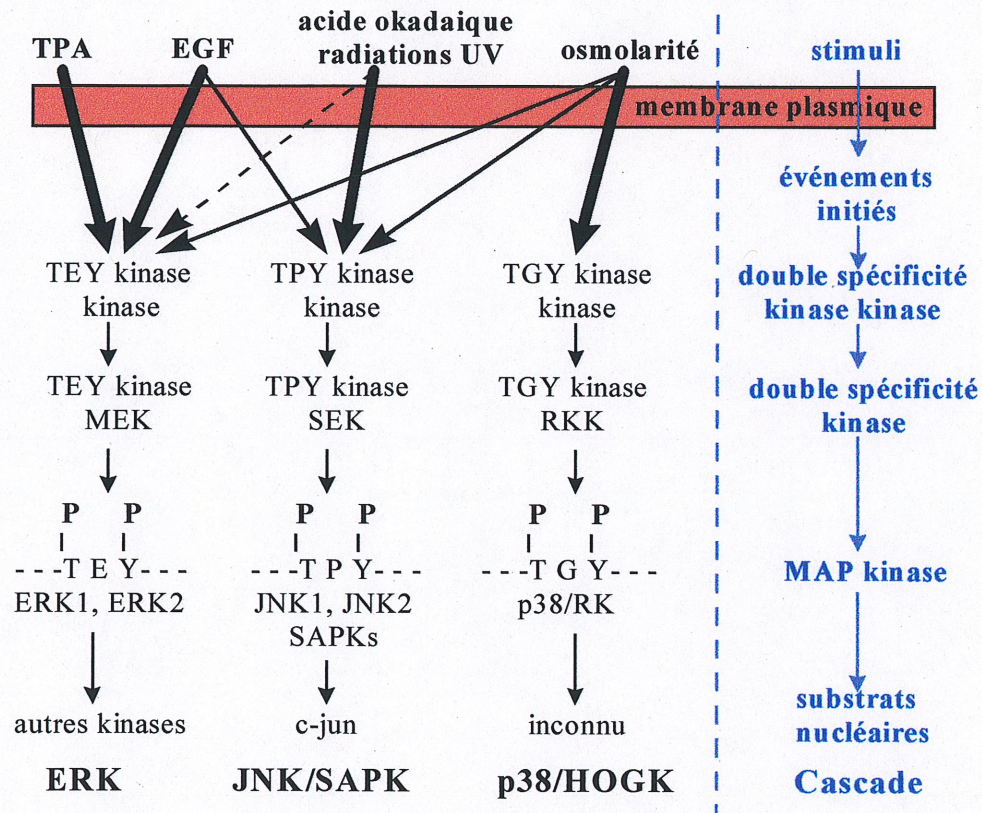
MAPKs constituent de bons modèles de mécanismes cellulaires capable de relier l'activation d'un récepteur, par une variété de stimuli, à diverses réponses physiologiques (Casanova et al., 1996). De plus, ces voies sont initiées par des molécules signaux contenant un domaine SH2 (Johnson et Vaillancourt, 1994). Les MAPKs reconnaissent plusieurs substrats différents dans une cellule, incluant les récepteurs de facteurs de croissance, les protéines associées aux microtubules, la phospholipase A<sub>2</sub> et des facteurs de transcription comme *Jun* et *Fos*. Ces substrats définis pour les MAPKs sont connus pour être impliqués dans les réponses mitogéniques et de différenciation de différents types cellulaires (Johnson et Vaillancourt, 1994).

Les membres de cette famille sont activés par une double phosphorylation sur une thréonine et une tyrosine qui est catalysée par une kinase possédant une double spécificité. En fait, les voies MAPKs ont dans leur cascade un noyau composé de trois kinases : une protéine sérine/thréonine kinase (MAPKKK), qui phosphoryle et active une protéine kinase à double spécificité (MAPKK) qui à son tour phosphoryle et active une autre sérine/thréonine kinase (MAPK) (Marshall, 1995). Les MAPKKs phosphorylent les résidus thréonines et tyrosines qui sont adjacents à une proline; elles sont des protéines kinases proline-dirigées (Cano et Mahadevan, 1995).

Jusqu'ici, on peut observer un arrangement de trois cascades différentes dans la famille des MAPKs (voir figure 6). La première, la cascade ERK (extracellular signal-regulated kinase), est activée par des facteurs de croissance, des mitogènes et des cytokines. Cette voie implique un mécanisme Ras-dépendant et c'est la plus étudiée jusqu'à maintenant (Casanova et al., 1996). Dans cette cascade, deux protéines, Raf et MEKK, correspondent à MAPKKK tandis que MEK représente MAPKK et ERK fait référence à MAPK (Marshall, 1995). On a aussi la cascade p38/HOGK (high osmolarity glycerol response) qui est activée par des radiations U.V., divers stress, la cytokine proinflammatoire IL-1 et le TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ). Pour cette cascade, les trois protéines kinases du noyau sont représentées respectivement par MKK3/6, RKK et p38/RK (Tibbles et al., 1996). Et finalement, la cascade



JNK/SAPK(c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase/Stress-activated protein kinase) qui est aussi activée par des stimuli semblables à ceux de la voie p38/HOGK mais qui constitue une voie différente (Casanova et al., 1996). JNK/SAPK implique aussi la protéine Ras dans sa voie, mais également MEKK-1 comme MAPKKK, SEK-1 pour MAPKK et enfin JNK/SAPK comme MAPK (Marshall, 1995). En plus de la protéine Ras, la voie JNK/SAPK peut aussi faire intervenir Rac et Cdc42, deux petites GTPases, pour son activation. Les protéines Rac et Cdc42 sont surtout activées en réponse aux cytokines (Coso et al., 1995).



**Figure 6 : Présentation d'un arrangement parallèle possible des trois cascades de transduction de signaux.** Ces voies impliquent les membres de la famille des MAPKs. Les grosses flèches indiquent les réponses majeures aux stimuli alors que les petites flèches montrent les réponses qui sont moins fréquentes. La flèche brisée correspond à une stimulation très rare (Cano et Mahadevan, 1995).



L'analyse de la séquence primaire des protéines JNKs, ERKs ainsi que des HOGKs indique qu'elles ont toutes une certaine relation puisque les sites de phosphorylation pour leur activation (Thr et Tyr) sont conservés. Par contre, ces sites sont localisés dans des motifs de double phosphorylation distincts : TPY(ThrProThr) pour les JNKs , TEY(ThrGluTyr) pour les ERKs et finalement, TGY(ThrGlyTyr) pour les HOGKs (Cano et Mahadevan, 1995).

Bon nombre de facteurs peuvent influencer une cellule dans sa décision d'aller vers la différenciation ou vers la prolifération. Par exemple, on a montré que selon la durée d'activation de la protéine kinase ERK, des cellules vont soit proliférer ou se différencier. Une activation soutenue de ERK se traduit par une translocation au noyau alors qu'une activation transitoire ne provoque pas de translocation nucléaire. Une activation transitoire va avoir des conséquences bien différentes sur l'expression de gènes comparativement à l'activation soutenue puisqu'une accumulation nucléaire de protéines ERKs entraîne la phosphorylation de facteurs de transcription. De cette façon, la différence quantitative d'activation des ERKs se transpose sur la différence qualitative dans l'activation de facteurs de transcription. De plus, la réponse cellulaire dépend aussi du type de cellules. Ainsi, dans le modèle cellulaire PC12, l'activation soutenue des ERKs amène toujours la différenciation alors que la transitoire provoque la prolifération. Par contre, il est clair que dans les fibroblastes, une activation prolongée de ERK est associée à la prolifération et non la différenciation (Marshall, 1995).

Plusieurs étapes dans les cascades MAPKs sont conservées à travers les espèces et beaucoup d'homologues ont été découverts entre les cellules des mammifères et les levures (Cano et Mahadevan, 1995). La compréhension des cascades retrouvées chez les cellules des mammifères est cependant plus complexe que pour celles des levures puisque, contrairement à ces dernières, les voies MAPKs des cellules mammifères peuvent être activées simultanément via des cascades parallèles distinctes et ce, en réponse au même stimulus. Ainsi, les rayons U.V. peuvent activer à la fois les voies JNK/SAPK et p38/HOGK. De plus, une même voie peut être stimulée par des mécanismes d'activation différents. Comme par exemple : les événements de phosphorylation dans MEK, induit par MEKK ou Raf-1 ne sont pas

identiques. MEKK phosphoryle préférentiellement Ser<sup>218</sup> alors que Raf-1 ne démontre aucune préférence ni pour Ser<sup>218</sup> ni pour Ser<sup>222</sup>. Cette différence entre Raf-1 et MEKK peut représenter des mécanismes d'activation de MEK et de sa voie de transduction qui sont séparés. Ceci illustre bien comment une même protéine peut être activée de façon différente selon le signal reçu à la surface de la cellule (Malarkey et al., 1995).

#### **1.4 La famille MLK**

Avec le développement de nouvelles techniques de clonage, plus particulièrement celle de la polymérisation en cascade (PCR, polymerase chain reaction), on a pu, depuis quelques années, faire la découverte de plusieurs nouvelles protéines kinases. Le PCR est une méthode qui fait appel à l'utilisation d'oligonucléotides, dégénérés ou non, comme amorces. Celles-ci correspondent à des motifs de séquences d'acides aminés qui sont hautement conservés et qui se retrouvent dans le domaine catalytique des protéines kinases (Hanks et al., 1988).

L'utilisation de la technique de PCR dans l'étude des protéines kinases a conduit à l'identification d'une nouvelle famille de protéines kinases intracellulaires, les MLKs (mixed-lineage kinases), qui sont des activateurs des voies MAPKs. Les membres de cette famille possèdent la particularité de contenir à l'extérieur de leur domaine kinase un domaine leucine-zipper analogue à ceux retrouvés dans les facteurs de transcription. La présence de ce nouvel élément n'avait jamais été identifié auparavant comme une composante des protéines kinases (Dorow et al., 1993).

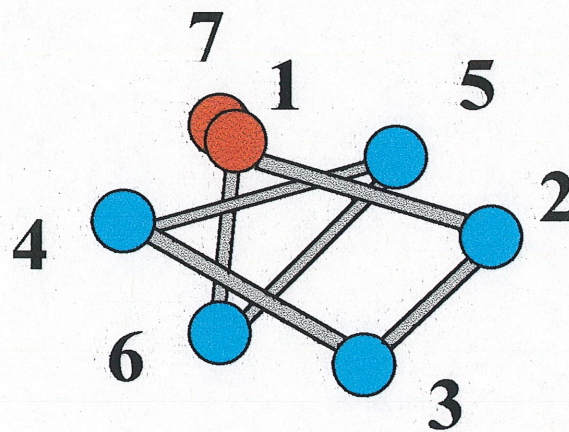
Les deux premiers membres de cette famille ont été clonés par le groupe de Dorow et al. en 1993. On retrouve dans la séquence de ces deux protéines un domaine catalytique unique. En effet, bien que cette séquence soit très proche de celle retrouvée dans les protéines tyrosine kinases, elle contient également des motifs associés aux sérine kinases. De ce fait est né le nom de cette nouvelle famille, soit MLK pour mixed lineage kinase, et de ces deux premiers



membres : MLK1 et MLK2 (Dorow et al., 1993). En plus de leur domaine catalytique unique, ces deux protéines kinases possèdent un domaine d'homologie Src 3 (SH3) et une portion basique située juste après les deux domaines leucine-zipper (Dorow et al., 1995).

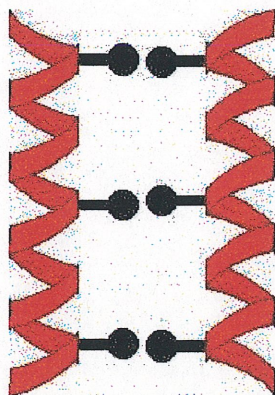
### 1.5 Le domaine leucine-zipper

Pour revenir sur le domaine leucine-zipper des MLKs, il est intéressant de noter que ce genre de portion régulatrice est souvent retrouvée dans les facteurs de transcription comme *fos*, *jun* et *myc*. La séquence d'un leucine-zipper contient un résidu leucine ou isoleucine à toute les septièmes positions pour une longueur minimale de 22 acides aminés (voir figure 7). La disposition de ces résidus donne une conformation hélicoïdale amphipatique avec une chaîne de leucine formant une raie sur une seule face (Dorow et al., 1995). Comme on peut voir à la figure 8, les domaines leucine-zipper permettent la formation de dimères par une interaction hydrophobe entre les chaînes de leucines. Les protéines kinases qui possèdent ces domaines peuvent soit former des homodimères (deux protéines identiques) ou bien des hétérodimères (deux protéines différentes).



**Figure 7 : Représentation schématique de la disposition des leucines en septième position dans un domaine leucine-zipper.** Les boules rouges correspondent aux résidus leucines trouvés à toutes les septièmes positions dans un domaine leucine-zipper.





**Figure 8 : Représentation schématique de la formation d'une interaction entre deux domaines leucine-zipper.** Les petites boules noirs correspondent aux résidus leucines que l'on retrouve alignés sur une seule face de l'hélice et qui constituent le domaine leucine-zipper.

En 1994, deux nouveaux membres se sont ajoutés à la famille MLK. D'abord MLK3/SPRK/PTKI (Ezoe et al., 1994 ; Gallo et al., 1994 ; Ing et al., 1994) qui est très près de MLK1 (Dorow et al., 1995). Cette protéine contient sur l'ensemble de sa séquence un domaine SH3, un domaine catalytique, deux motifs leucine-zipper séparés par une courte séquence, un domaine de liaison à Rac/Cdc42, et enfin, une région proline-riche en carboxyl-terminal (Rana et al., 1996). Puis finalement, ZPK/DLK/MUK cloné par quatre groupes de recherche indépendants.

#### 1.6 ZPK/DLK/MUK

D'abord, Reddy et Pleasure ont isolé à partir de la lignée de cellules neuronales humaine NT2, une nouvelle sérine/thréonine kinase contenant deux domaines leucine-zipper séparés par une séquence de 25 acides aminés. Ils ont baptisé leur nouvelle découverte ZPK pour Zipper Protein Kinase (Reddy et Pleasure, 1994). Cette nouvelle kinase, bien que reliée moins intimement aux autres membres, fait partie de la famille MLK. Il faut aussi noter que ZPK ne possède pas de domaine SH3.



```

souris 1 MACLHETRTPSPSPGGFASTLSEASMRNVDPDTS DCTPEKDLTPTQCVL RDVVP LGGQGG 60
humain 1 MACLHETRTPSPSPGGFVSTLSEASMRKLDPDTS DCTPEKDLTPH..... 46

souris 61 GGPSPPSGGEPPEPFANSVLQLHEQDTGGPGGATGSPESRASVRADDEVRLQCQSGSGF 120
humain 47 .....VLQLHEQDAGGPGGAAGSPESRASVRADDEVRLQCQSGSGF 87

souris 121 LEGLFGCLRPVWMTIGKAYSTEHKQQQEDLWEVPFEEILDLOWVGSGAQQGAVFLGRFHGE 180
humain 88 LEGLFGCLRPVWMTIGKAYSTEHKQQQEDLWEVPFEEILDLOWVGSGAQQGAVFLGRFHGE 147
I

souris 181 EVAVKKVRDLKETDIKHLRKLKHPNIIITFKGVCTQAPCYCILMEFCAQQQLYEVLRAGRP 240
humain 148 EVAVKKVRDLKETDIKHLRKLKHPNIIITFKGVCTQAPCYCILMEFCAQQQLYEVLRAGRP 207
II III IV V

souris 241 VTPSLLDVWSMGIAGGMNYLHLHKIIHRDLKSPNMLITYDDVVKISDFGTSKELSDKSTK 300
humain 208 VTPSLLDVWSMGIAGGMNYLHLHKIIHRDLKSPNMLITYDDVVKISDFGTSKELSDKSTK 267
VIA VIB VII

souris 301 MSFAGTVAWMAPEVIRNEPVSEKVDIWSFGVVLWELLTGEIPYKD VDS SAI IWVGVSNSL 360
humain 268 MSFAGTVAWMAPEVIRNEPVSEKVDIWSFGVVLWELLTGEIPYKD VDS SAI IWVGVSNSL 327
VIII IX X

souris 361 HLPVPSSCPDGFKILLRQCWNTPRNRPSFRQILLHLDIASADVLSTPOETYFKSQA EWR 420
humain 328 HLPVPSSCPDGFKILLRQCWNTPRNRPSFRQILLHLDIASADVLSTPOETYFKSQA EWR 387
XI

souris 421 EEYKLHFEKIKSEGTCLHRL EEEELVMRRREELRHALDI REHYERKLERANNLYMELNALM 480
humain 388 EEYKLHFEKIKSEGTCLHRL EEEELVMRRREELRHALDI REHYERKLERANNLYMELNALM 447

souris 481 LQELKERELLRRDEALERRC PGLLKSHPSRGLLHGDTMEKLIKRNVPQKLSPHSKRPD 540
humain 448 LQELKERELLRRDEALERRC PGLLKSHPSRGLLHGDTMEKLIKRNVPQNLSPHSQRPD 507

souris 541 ILKTESLLPKLDAALSGVGLPGCPKPPSPGRSRRGKTRHRKASAKGSCGDL PGLRAALP 600
humain 508 ILKAESLLPKLDAALSGVGLPGCPKAPPSPGRSRRGKTRHRKASAKGSCGDL PGLRTAVP 567

souris 601 PHEPGGLGSPGGLGVGPSAWDACPPALRGLHHDLLLRKMSSSSPDLLS AALGARGRGATG 660
humain 568 PHEPGGPGSPGGLGGGPSAWEACPPALRGLHHDLLLRKMSSSSPDLLS AALGSRGRGATG 627

souris 661 GARDPGSPPPPGDTPPSEGSAPGSTSPDSPGGAKGEP PPVGPGEVGLLGTGREGTAG 720
humain 628 GAGDPGSPPPARGDTPPSEGSPPGSTSPDSPGGAKGEP PPVGPGEVGLLGTGREGTSG 687

souris 721 RGGNRAGSQHLTPAALLYRAAVTRSQKRGISSEEEGEVDSEVELPPSQRWPQGPNNRQS 780
humain 688 RGGSRAGSQHLTPAALLYRAAVTRSQKRGISSEEEGEVDSEVELTSSQRWPQSLNNRQS 747

souris 781 LSTFSSENPSDVEGGTASEPSPSGTPEVGSTINTDERPDRSDDMCSQSGSEIPLDLP TSEV 840
humain 748 LSTFSSENPSDGEETASEPSPSGTPEVGSTINTDERPDRSDDMCSQSGSEIPLDPP PSEV 807

souris 841 VPEREASSLPQH.....DQGPNPEDSDCDSTELDNSNSIDALRPPASLPP 888
humain 808 IPGPEPSSLPIPHQELLRERGPPNSEDSDCDSTELDNSNSVDALRPPASLPP 859

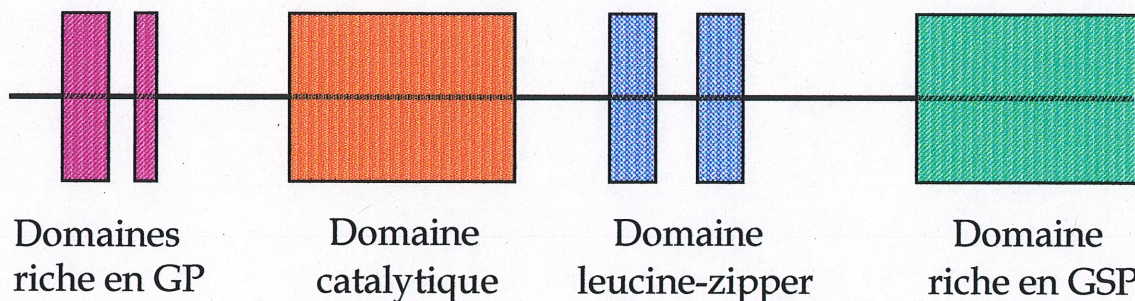
```

**Figure 9 : Comparaison des séquences d'acide aminé de ZPK murin et humain.** Les résidus identiques sont identifiés par une ligne verticale. Les sous-domaines I-XI des protéines kinases sont indiqués. Les deux domaines leucine-zipper sont soulignés avec en gras, les acides aminés responsables des interactions (Blouin et al., 1996).



Un deuxième groupe, c'est-à-dire celui de Holzman, a identifié à partir de la souris une nouvelle protéine kinase qu'ils ont nommée DLK, pour Dual Leucine-zipper Kinase, et qui possède les mêmes caractéristiques structurales que tous les membres de la famille MLK (Mata et al., 1996). La comparaison de la séquence de DLK avec celle de ZPK démontre qu'il s'agit de la même protéine mais isolée à partir d'espèces différentes soit la souris et l'humain. Ces deux protéines kinase forment donc le quatrième membre de la famille MLK.

Au moment de la sortie de ces deux articles, soit en 1994, le groupe du Pr. Blouin avait isolé et séquencé une nouvelle protéine kinase chez la souris (Beaudoin et al., 1994). La comparaison de cette séquence avec celles des différents membres de la superfamille des protéines kinases a démontré un haut degré d'homologie avec un gène humain récemment décrit soit ZPK. Ainsi, la souris et l'homme partagent, pour cette protéine, une homologie de 99% au niveau du domaine catalytique et de 95% sur l'ensemble de la séquence (voir figure 9). Ce qui diffère le plus entre ces deux espèces, c'est leur région extracatalytique amino-terminale où on peut retrouver une région additionnelle de 33 acides aminés dans la séquence murine (Blouin et al., 1996). La figure 10 nous montre la structure primaire de ZPK murin où l'on peut observer la disposition des différents domaines.



**Figure 10 : Représentation schématique de la structure primaire de ZPK murin. G : Glycine, P : Proline, S : Sérine.**

Finalement, en 1996, le groupe de Hirai et al. a cloné la version rat de la protéine kinase ZPK/DLK et ils l'ont nommée MUK pour MAPK-upstream kinase (Hirai et al., 1996). On verra un peu plus loin pourquoi ils ont choisi ce nom.

### **1.7 Fonction de ZPK/DLK/MUK**

Dans le premier travail publié par Reddy et Pleasure, on a réalisé une analyse de type Northern sur une variété de tissus humains adultes et embryonnaires afin d'identifier les tissus exprimant le gène ZPK. Pour l'adulte, le cœur, le cerveau, le placenta, le poumon, le foie, le muscle squelettique, le rein et le pancréas ont été étudiés tandis que chez l'embryon, seuls le cœur, le cerveau, le poumon, le foie et le rein ont été analysés. Les résultats obtenus ont montré la présence d'un transcrit de 3.4 kb dans le cerveau tant chez l'adulte que chez l'embryon. Et chez l'adulte, ils ont aussi observé un transcrit plus petit, soit d'environ 3.0 kb, dans le rein et le muscle squelettique et finalement, dans le poumon, on retrouve la présence des deux transcrits mais à des niveaux très faibles. De plus, ils ont noté que le niveau d'ARNm de ZPK était plus élevé dans les cellules NT2 différenciées en neurones que dans les NT2 non-différenciées, ce qui suggère un lien possible entre ZPK et la différenciation (Reddy et Pleasure, 1994).

Par la suite, le groupe de Holzman publia des analyses de type Northern sur des extraits d'ARN totaux de plusieurs tissus de souris adultes démontrant l'expression d'un transcrit d'environ 3.6 kb surtout exprimé dans le cerveau mais aussi faiblement dans les ovaires. En utilisant la protection à la RNase sur des extraits de tissus adultes et aussi embryonnaires, ils ont repéré une expression dans le cerveau, les reins, les poumons et le cœur et ce, pour tous les stades de développement examinés (Holzman et al., 1994). Toujours dans ce même article, ils rapportent la production d'un anticorps polyclonal dirigé contre une protéine de fusion recombinante contenant 223 acides aminés de la portion COOH-terminale de DLK. Ils ont montré que cet anticorps reconnaissait une protéine de poids moléculaire de 130 KDa dans les cellules COS-7 transfectées de façon transitoire avec un vecteur d'expression contenant le

cDNA complet de DLK. Ils ont également détecté une protéine à 130 KDa dans les cellules COS-7 transfectées transitoirement avec un vecteur d'expression contenant la séquence DLK étiquetée avec une épitope pour laquelle un anticorps monoclonal existe commercialement. Et finalement, en utilisant cette dernière construction, ils ont réalisé un essai kinase *in vitro* et ont démontré que la protéine de 130 KDa qui immunoprécipitait avec l'anticorps monoclonal pouvait s'autophosphoryler sur les résidus sérine et thréonine et donc, qu'elle possède une activité sérine/thréonine kinase *in vitro* (Holzman et al., 1994).

Dans une seconde publication sortie en juillet 1996, ce même groupe a observé que la protéine DLK pouvait être soit cytosolique ou bien associée à la membrane plasmique. De plus, ils suggèrent que dans la fraction cytosolique, DLK pourrait exister sous deux formes l'une phosphorylée et l'autre non-phosphorylée. Par contre, lorsqu'elle serait associée à la membrane, DLK n'existerait que sous la forme déphosphorylée. Ils ont aussi montré dans cet article que DLK pouvait former des homodimères lorsque son ADNc était transfecté et surexprimé dans des cellules COS-7 (Mata et al., 1996). Bien qu'ils n'en aient pas observé, leurs études n'excluent pas la possibilité pour DLK de former des oligomères.

Dans les deux premières publications (Blouin et al., 1996 et Nadeau et al., 1997) provenant de notre laboratoire, des expériences d'analyse de type Northern et d'hybridation *in situ* ont été réalisées autant chez la souris adulte que chez la souris embryonnaire. Au niveau des tissus adultes, on a pu détecter un seul transcrit de 3.5 kb et ce, uniquement dans le cerveau (Blouin et al., 1996). Par hybridation *in situ*, on a observé une très forte expression dans le cerveau, surtout localisée dans les cellules qui ont atteint un stade de différenciation terminale comme dans l'hippocampe, le cortex cérébral et les cellules de Purkinje du cervelet. Aussi, on a pu observer la présence de l'ARNm de ZPK dans les épithéliums de la peau et de l'intestin au niveau encore une fois de cellules différenciées ou en voie de différenciation. Rien ne fut détecté dans les couches de cellules en prolifération (Blouin et al., 1996).

Pour ce qui est du stade embryonnaire, on a pu voir par une analyse de type Northern que l'expression de l'ARNm de ZPK débute seulement à partir du 11<sup>ème</sup> jour de développement. L'hybridation *in situ* a quant à elle révélé une forte expression au niveau du cerveau et dans une variété d'organes nécessitant des interactions épithélio-mésenchymateuses pour leur développement. De plus, dans ces tissus, l'expression est localisée dans les régions composées de type spécifique de cellules différenciées. Aussi, l'augmentation d'expression qu'on a pu observer au cours du développement embryonnaire semble liée à l'atteinte de la différenciation terminale (Nadeau et al., 1997).

On peu avant, on a vu que le groupe de Hirai a cloné la version rat de ZPK/DLK qu'ils ont appelé MUK. En fait, ce groupe a montré qu'il existait une homologie significative entre le domaine kinase de MUK et celui des protéines reliées aux MAPKKKs. De plus, leurs études suggèrent que MUK est capable d'activer la voie JNK/SAPK de façon similaire à MEKK, par l'entremise de protéines reliées aux MAPKKs comme SEK1/MKK4/JNKK ou autres activateurs de la voie JNK/SAPK non identifiés. C'est pourquoi ils ont nommé leur protéine MUK pour MAPK-Upstream Kinase, puisque les JNKs font partie de la famille MAPK. Ils ont aussi effectué une analyse de type Northern sur des tissus de souris et ils ont observé un transcrit de 3.8 kb spécialement exprimé dans le cerveau mais aussi dans les ovaires, les testicules, l'utérus et également dans les lignées de cellules NIH3T3 et P19 EC (embryonal carcinoma) (Hirai et al., 1996).

Dans un troisième article, Holzman a établi une relation entre DLK et la grande famille des MAPKs. En effet, comme la séquence du domaine catalytique de DLK est similaire à celle retrouvée chez les MAPKKKs, son laboratoire a investigué la possibilité d'un rôle dans les cascades MAPKs. En effectuant des expériences de cotransfection et de surexpression de différentes constructions dans les cellules COS-7 et NIH 3T3, ils ont observé que DLK pouvait activer p46<sup>SAPK</sup> (JNK/SAPK) et p38<sup>mapk</sup> (Fan et al., 1996).



Finalement, dans notre laboratoire, une autre étude a pu montrer un effet inhibiteur de la protéine ZPK sur la prolifération cellulaire. Pour ce faire, l'ADNc de celle-ci a été transfecté et exprimé dans la lignée de cellules NIH 3T3. Suite à l'expression cet ADNc, les NIH 3T3 ont cessé de proliférer. On a également montré que si on effectue la délétion du domaine de fixation à l'ATP, ZPK devient alors incapable ou presque d'exercer son effet inhibiteur sur les cellules NIH 3T3 (Bergeron et al., 1997).

## **1.8 DESCRIPTION DU PROJET DE MAÎTRISE**

Ce que l'on peut retenir de toutes les études qui ont été réalisées, c'est que le gène ZPK est exprimé dans des populations de cellules spécifiques qui ont atteint un stade de différenciation terminale ou qui sont en voie de différenciation. De plus, ce gène s'exprime plus fortement au niveau du cerveau et si on se rappelle l'étude effectuée par Reddy et Pleasure (1994), ils avaient observé que le niveau d'ARNm de ZPK était plus élevé dans les cellules NT2 différenciées en neurones que dans les NT2 non différenciées. Étant donné que ZPK semble être relié à la différenciation cellulaire et que son expression est prédominant dans les cellules nerveuses, nous avons développé l'idée de poursuivre nos recherches en utilisant un modèle cellulaire nerveux.

Il existe aujourd'hui plusieurs lignées de cellules qui constituent de bons modèles d'étude. Pour être sélectionné, la lignée de cellules devait répondre à quelques critères. D'abord, on ne voulait pas choisir une lignée qui avait déjà été utilisée dans les études publiées sur ZPK et DLK pour apporter du nouveau. Aussi, les cellules devaient pouvoir se différencier en cellules nerveuses pour les raisons mentionnées plus haut. À ce stade-ci, deux lignées de cellules étaient à notre disposition soit les PC12 (rat) et les P19 (souris). Un autre critère était la facilité de culture et la vitesse de prolifération. Les cellules PC12 demandent plus de précaution pour leur culture surtout au niveau du passage des cellules car celles-ci ont tendance à s'agréger et à adhérer moins bien au pétri. De plus, la vitesse de prolifération de ces cellules

n'est pas très élevée. Par contre, les P19 ont une vitesse de prolifération très grande qui permet d'obtenir rapidement le nombre de cellules requis pour effectuer des expériences. Et les cellules P19 ne demandent pas de soins particuliers pour leur culture. Ainsi, pour continuer d'étudier la relation possible entre ZPK et la différenciation cellulaire, nous avons choisi comme modèle cellulaire la lignée de cellules P19.

La lignée de cellules P19 dérive d'un tératocarcinome embryonnaire de souris. Ces cellules sont pluripotentes puisque, selon le traitement utilisé, on peut induire leur différenciation dans la voie des cellules nerveuses ou des cellules musculaires cardiaques ou squelettiques (Jones-Villeneuve et al., 1982) (Smith et al., 1987). La diversité d'induction de ces cellules a permis à cette lignée de devenir un modèle cellulaire grandement utilisé en recherche. Dans notre cas, nous avons employé le traitement qui permet d'obtenir des cellules nerveuses. La première partie de mon projet avait donc les deux objectifs suivants : étudier les niveaux d'expression de l'ARNm de ZPK avant et après l'induction de la différenciation neuronale de la lignée de cellules P19 et établir à quel niveau se situe la régulation de l'expression, soit transcriptionnelle ou bien post transcriptionnelle. De plus, en tenant compte des résultats obtenus précédemment, nous avons formulé **l'hypothèse de travail suivante : l'expression de l'ARNm de ZPK augmente avec la différenciation neuronale des cellules P19.**

La plupart des études réalisées dans le laboratoire ont porté sur l'ARNm. Pour ouvrir la voie à de nouvelles expériences et diriger notre étude sur la protéine ZPK, nous avons besoin d'un outil très important, soit un anticorps anti-ZPK. Celui-ci nous permettrait de réaliser des analyses de type Western sur notre modèle cellulaire P19 afin de comparer comment se comporte le niveau de synthèse de la protéine ZPK au cours de la différenciation par rapport au niveau d'ARNm. De plus, l'anti-ZPK nous donnerait l'occasion d'effectuer des expériences d'immunohistochimie sur des cellules en culture ou sur des coupes de tissus. Finalement, par immunoprécipitation, on aurait également la possibilité de faire des essais kinases afin de vérifier l'activité de ZPK et aussi d'identifier certains de ses partenaires. La réalisation de ces



expériences est importante car si on peut par exemple localiser ZPK au niveau cellulaire ou encore découvrir ses partenaires, nous aurons des indices importants sur la fonction de cette protéine.

Ainsi, la deuxième partie de mon projet avait pour but de produire un anticorps possédant une bonne spécificité pour la protéine ZPK. Une des approches grandement utilisée pour la production d'un anticorps contre une protéine, c'est d'introduire une portion de l'ADNc de cette protéine dans un vecteur bactérien permettant la production d'une protéine de fusion. La portion introduite doit être représentative de la protéine et aussi la plus spécifique possible ; par exemple, la portion catalytique ne serait pas un bon choix étant donné que cette dernière est hautement conservée dans les protéines kinases. Avec une telle portion, l'anticorps produit ne posséderait pas une bonne spécificité pour la protéine ZPK. De plus, la partie à introduire doit être assez longue pour provoquer une bonne immunisation chez l'organisme choisi pour produire l'anticorps. Pourquoi fabriquer une protéine de fusion ? Le but est simple, c'est pour permettre de purifier facilement la protéine que l'on veut injecter seul, sans contaminant. Dans notre cas, nous avons injecté à trois lapins une protéine recombinante comprenant une portion de ZPK, correspondant à l'extrémité 5', fusionnée à une étiquette riche en résidus histidines. Comme ces derniers ont une affinité pour le nickel, nous avons purifié notre protéine de fusion en utilisant une colonne de résine chargée au chlorure de nickel (NiCl).

## **CHAPITRE 2**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **2.1 Culture cellulaire**

La lignée de cellules P19 (ATCC No CRL 1825) était maintenue en culture dans le milieu  $\alpha$ -minimal essentiel medium ( $\alpha$ -MEM, Gibco) supplémenté de 10% sérum fœtal bovin (FBS, Gibco) et ce, dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. À tous les deux jours, les cellules étaient dispersées avec une solution de trypsine-EDTA (Gibco) et passées à une dilution se situant entre 1/5 et 1/10.

#### **2.2 Induction de la différenciation cellulaire**

Au jour 0, les cellules P19 ont été passées dans un petri bactériologique de 100 mm à une densité de 10<sup>5</sup> cellules/ml et cultivées pour une période de 4 jours dans le milieu  $\alpha$ -MEM supplémenté de 10% FBS et contenant 10<sup>-6</sup> M d'acide rétinolique (*all-trans*, Sigma). Au jour 2, les agrégats ont été resuspendus dans du milieu frais.

Au jour 4, les agrégats de cellules ont été dispersés avec une solution de trypsine-EDTA (Gibco) et passés sur pétri de culture pour une période additionnelle de 10 jours en absence d'agent inducteur. Le milieu était remplacé au deux jours et 4 jours après le passage sur pétri de culture, 5µg/ml de cytosine arabinosine furent ajoutés au milieu pour inhiber la prolifération des cellules non-neuronales.

#### **2.3 Extraction d'ARN total et Analyse de type Northern**

Les ARNs totaux ont été extraits des cellules P19 avant et après l'induction de la différenciation en utilisant le trizol (Gibco).

20 µg d'ARN total de chaque échantillon ont été préparés dans un volume final de 20µl d'une solution contenant 1X MOPS (20X: 0.4 M MOPS (Sigma), 0.1 M NaOAc, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA), 2.2 M formaldéhyde et 50 % formamide déionisé. Les échantillons ont été chauffés à 55°C pendant 15 minutes et déposés sur la glace quelques secondes. 2µl de bromure d'éthidium (0.2 µg/ml) ont ensuite été ajoutés ainsi que 0.1 volume de tampon de chargement (6X: 0.25 % de bromophénol bleu, 0.25 % de xylène cyanol FF et 30 % glycérol dans de l'eau). Les ARNs ont été déposés et fractionnés sur gel d'agarose 1.2 % contenant 1X MOPS et 1.1 M formaldéhyde.

Après séparation sur gel, les ARNs ont été transférés sur une membrane de nylon (Hybond-N, Amersham). Pour ce faire, le gel a d'abord été rincé dans de l'eau distillé puis trempé dans une solution 10X SSC (1X: 150mM NaCl et 15mM citrate de sodium pH 7.0) pendant 20 minutes. On a ensuite procédé au montage qui a permis le transfert par capillarité des ARNs du gel vers la membrane. Le transfert s'est effectué dans la même solution, soit 10X SSC, pour une durée de 12 à 18 heures. La membrane a par la suite été cuite entre deux papiers Whatman à 80°C pendant 2 à 4 heures.

### **2.3.1 Hybridation**

La membrane a d'abord été préhybridée pendant 4 heures à 42°C dans 10 ml d'une solution contenant 50% formamide déionisée, 0.5M NaHPO<sub>4</sub> pH 7.2, 1mM EDTA, 1% BSA et 5% SDS, puis hybridée dans la même solution contenant en plus la sonde dénaturée appropriée. L'hybridation se fait à 42°C pendant 16-24 heures.

### **2.3.2 Préparation de la sonde**

10 µg de plasmide KS-ZPK ont été digérés avec l'enzyme *Bam*H1 (Pharmacia) et un fragment de 1.9 kb a été purifié sur gel d'agarose LMP (low melting point). La même quantité

d'un plasmide contenant l'ADNc de la  $\beta$ -actine a été digéré avec *HindIII* (Pharmacia) et le fragment a été purifié de la même façon. Pour faire la sonde, environ 50-100 ng de fragments fut chauffé 2 minutes à 65°C pour faire fondre l'agarose et 25  $\mu$ l ont été prélevés et combinés à 9  $\mu$ l d'eau traité au diethylpyrocarbonate (DEPC). Le tout a été incubé 7 minutes à 96°C suivi de 10 minutes à 37°C. Par la suite, 10  $\mu$ l d'"Oligomix" (250 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM  $MgCl_2$ , 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2 mM de chaque dNTP (dATP, dGTP, dTTP), 1 M Hepes pH 6.6, 1 mg/ml oligonucléotides Pd(N)<sub>6</sub>) ont été ajoutés ainsi qu'un  $\mu$ l de Klenow (5.9U/ $\mu$ l) et 50  $\mu$ Ci d' $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP (Amersham) et on a incubé à la température de la pièce pendant 3 à 4 heures. Avant d'ajouter la sonde à la membrane, celle-ci a été dénaturée 2 minutes à 90-100°C puis placée sur la glace pendant quelques secondes.

### **2.3.3 Lavage**

Suite à l'hybridation, la membrane a été lavée deux fois 15 minutes dans une solution contenant 2X SSC et 0.1% SDS à la température de la pièce puis 30 minutes dans 0.2X SSC et 0.1% SDS à 65°C. La membrane a ensuite été exposé à un film Kodak (Biomax MS) pour l'autoradiographie.

### **2.4 Stabilité de l'ARNm**

Les cellules P19 non-différenciées et différenciées (agrégées durant 4 jours en présence d'acide rétinoïque suivi de 2 jours en culture monocouche) ont été traitées pendant 60 minutes avec 10  $\mu$ g de cycloheximide (CX)/ml. Après ce temps, certains pétris ont été lavés trois fois avec du PBS 1X et incubés dans du milieu contenant 5  $\mu$ g d'actinomycine D/ml tandis que les autres pétris ont été incubés dans les mêmes conditions mais avec en plus 10  $\mu$ g de CX/ml. Les ARNs totaux ont été extraits des P19 EC et P19 différenciées à différents temps suivant l'ajout de l'actinomycine D.

## 2.5 Transcription nucléaire

Les cellules P19 EC et P19 différenciées (agrégées durant 4 jours en présence d'acide rétinoïque suivi de 2 jours en culture monocouche) ont été rincées avec du PBS 1X et recueillies dans 1 ml (pour un pétri 100mm) de ce même tampon à l'aide d'un petit grattoir. Les cellules ont ensuite été centrifugées 5 minutes à 1000 rpm et le culot fut resuspendu dans un tampon de lyse (10mM Tris-HCl pH7.4, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl et 0.5% nonidet P-40) à une concentration de 10<sup>7</sup> cellules/ml. On a incubé le tout 5 minutes sur la glace et les noyaux ont été culotés 30 secondes à 13000 rpm. Ces derniers ont ensuite été resuspendus dans 210µl de tampon de congélation (50mM Tris-HCl pH7.4, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 40% glycérol, 0.5mM dithiothreitol) et 100 unités de RNAsin/ml (Promega) ont été ajoutés. Les noyaux ont été congelés immédiatement à -70°C et conservé jusqu'à l'utilisation.

La transcription nucléaire a été réalisée avec 1 x 10<sup>7</sup> noyaux. Les transcripts naissants d'ARNm ont subi une élongation de 30 minutes à 28°C en présence [α-<sup>32</sup>P]UTP et l'analyse de la transcription nucléaire a été réalisée selon la méthode de Nepveu et Marcu (Nepveu et Marcu, 1986). Les ARNs synthétisés *in vitro* ont été hybridés à des plasmides dénaturés et immobilisés sur membrane de nitrocellulose (5µg de chaque). Les plasmides contenaient soit l'ADNc de ZPK murin, de la tubuline murine, ou de la GAPDH de rat. Le plasmide pKS+ (Stratagene) a été utilisé comme contrôle pour l'hybridation non-spécifique.

## 2.6 Construction et Production d'une protéine de fusion

Pour la construction d'une protéine de fusion, le fragment *XhoI-EcoRI* provenant de l'ADNc de ZPK, et correspondant à 276 acide aminés de la portion amino-terminale, a été introduit dans les sites de clonage *XhoI-EcoRI* du vecteur d'expression bactérien pRSETB (Invitrogen). Ce vecteur permet la production d'une protéine recombinante fusionnée à une séquence de 6 histidines. L'amplification du vecteur pRSETB-ZPK a été réalisée dans la

bactérie E.Coli DH5 $\alpha$  alors que pour la production de la protéine de fusion, la bactérie E.Coli BL-21 fut utilisée.

Après la transformation du plasmide pRSETB-ZPK dans la souche bactérienne E.Coli BL-21, une colonie a été prélevée et mise en culture dans 5 ml de milieu LB, contenant 5  $\mu$ l d'ampicilline (100 mg/ml) et 5 $\mu$ l de chloramphénicol (34 mg/ml), pendant toute une nuit à 37°C avec agitation. Par la suite, la culture de 5 ml a été transférée dans 25 ml de LB, contenant la même concentration d'ampicilline et de chloramphénicol, et la culture s'est poursuivie jusqu'à l'atteinte d'une densité optique de 0.6 à 260 nm. Rendu à ce point, les bactéries ont été induites pour exprimer la protéine de fusion pendant 3 heures avec 1mM d'IPTG. Après l'induction, les bactéries ont été culotées et congelées à -70°C jusqu'à utilisation.

## **2.7 Extraction et purification**

L'extraction et la purification de la protéine de fusion a été effectuée avec la trousse « Xpress<sup>TM</sup> System Protein Purification » d'Invitrogen, version C(160612). Ce système comprend une colonne composée de résine chargée au chlorure de nickel qui va retenir les protéines recombinantes contenant la séquence de 6 histidines durant le passage du lysat. Comme on le sait, les résidus histidines ont une affinité pour le nickel. Ceci permet donc la purification de la protéine de fusion ZPK-(His)<sub>6</sub>.

L'extraction et la purification a été réalisée en condition dénaturante. Brièvement, les bactéries ont été lysées dans un tampon de lyse contenant de la guanidine à pH 7.8. Le lysat a été passé sur la colonne de purification fait de résine chargée avec du chlorure de nickel (ProBond<sup>TM</sup> Resin) et par la suite, la colonne a été lavée deux fois avec du tampon de liaison dénaturant, deux fois avec du tampon de lavage dénaturant pH 6.0, et finalement, deux autres fois avec du tampon de lavage dénaturant pH 5.3. La protéine de fusion a été éluée avec du tampon d'élution dénaturant pH 4.0. On a récolté 5 fractions de 1 ml puis réuni celles où on

retrouvait le plus de protéines suite à la vérification sur gel SDS-polyacrylamide. Les fractions réunies ont été dialysées contre 10 mM Tris-HCl pH 8 pendant toute une nuit à 4°C avec agitation.

## **2.8 Concentration de la protéine de fusion**

La concentration de notre protéine de fusion a été effectuée avec des microcolonnes dont la grosseur des pores étaient de 10 000 daltons (microconcentrators, microcon, Amicon, publication 1-394G). Les protéines ont été conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

## **2.9 Production d'un anticorps anti-ZPK**

Pour la production d'un anticorps anti-ZPK, on a injecté la protéine de fusion à trois lapins. La première étape fut la prise de sérum pré-immun pour chacun des lapins. Pour ce faire, environ 2 ml de sang ont été prélevés par une veine dans l'oreille des lapins. Après avoir reposé pendant une heure à la température de la pièce, le sang a été centrifugé 15 minutes à 10 000 rpm à 4 °C. Le sérum a ensuite été transféré dans un tube à congélation et placé à -80°C. Pour la production de l'anticorps, la procédure fut la suivante : on a réalisé un mélange 50 :50 de protéines de fusion avec un adjuvant, le TiterMax (CytRx corporation). Environ 300 µg de protéines contenues dans un volume de 250 µl d'une solution saline 0.9% NaCl ont été émulsionnées avec 250 µl de TiterMax à l'aide de deux seringues de 1 ml reliées entre elles par une aiguille 18G. La procédure suivie fut celle décrite dans le manuel du manufacturier. Chaque lapin a reçu deux injections intramusculaires de 40 µl (une dans chaque quadriceps) et quatre injections sous-cutanées de 20 µl pour un total d'environ 160 µl par lapin. Après 4 semaines, pour vérifier la production d'anticorps, 1ml de sang a été prélevé de chaque lapin et le sérum fut récupéré de façon similaire au sérum pré-immun. La présence d'anticorps a été examinée par une analyse de type Western effectuée sur la protéine de fusion ZPK-(His)<sub>6</sub> (voir le protocole au point 2.10). Finalement, après 4 autres semaines, le sang de chaque lapin a été

recueilli par exsanguination. Suite à une coagulation de 12 heures à 4°C et le sang a été centrifugé pour récupérer le sérum. Ce dernier est conservé à -80°C.

## **2.10 Analyse de type Western sur la protéine de fusion**

Environ 5-10 µg de protéines de fusion ont été déposées sur gel SDS-polyacrylamide. Après la migration, le gel a été transféré dans une solution TB (Transfer Buffer : pour 250ml, 1.45g Tris base, 0.735g glycine, 0.095g SDS et 50ml méthanol) durant 10 à 15 minutes en vue du transfert semi-sec sur membrane PVDF (Amersham). La membrane a été préparée de la façon suivante : 5 secondes dans 100% méthanol, 5 minutes dans de l'eau distillée et 10 à 15 minutes dans la solution TB. Après la préparation de la membrane, le montage pour le transfert semi-sec a été réalisé selon les instructions fournies avec l'appareil SEMI-PHOR<sup>TM</sup> (Hoefer Scientific Instruments). Le transfert a été effectué pendant 1 heure, par un courant de 40 mA pour un mini gel (0.8 mA/cm<sup>2</sup>). La membrane a ensuite été incubée toute la nuit à 4°C dans une solution TBS-T (Tris-buffered saline-Tween : 0.02 M Tris-HCl pH7.5, 0.15 M NaCl et 0.05 % Tween-20) contenant 5% de lait en poudre (Carnation).

Nous avons utilisé la trousse « Enhance Chemiluminescence » de la compagnie Amersham pour l'immunodétection. Brièvement, la membrane a été incubée avec l'anticorps primaire, soit l'anti-ZPK, à une dilution de 1:250 000 pendant 1 heure, puis lavée dans la solution TBS-T et incubée de nouveau 1 heure mais avec un anticorps secondaire provenant de la trousse ECL (Amersham). Cet anticorps est dirigé contre les IgG de lapin et est couplé à une peroxidase pour permettre la détection. La membrane a ensuite été lavée avec la solution TBS-T et la détection a été réalisée. Pour ce faire, la membrane a été incubée 1 minute avec une petite quantité de solution de détection provenant du trousse ECL et exposée à un film Kodak (Biomax MS) pour des périodes variables (30 secondes à 10 minutes).



## 2.11 Analyse de type Western sur la protéine ZPK traduite *in vitro*

Environ 10µg de plasmide pSP64-ZPK ont été digérés avec l'enzyme *SspI* (Pharmacia). Après la digestion, deux extractions au phénol/chloroforme ont été réalisées sur le plasmide pSP64-ZPK digéré et celui-ci a été précipité avec de l'éthanol 100% pendant 40 minutes sur de la glace sèche. Le plasmide a été resuspendu dans 10µl d'eau distillé. Les quantités suivantes ont été mélangées pour réaliser la transcription de l'ADNc de ZPK : 4µl de tampon de transcription 5X, 2µl de DTT (100mM), 1µl de RNA Guard (Pharmacia), 5µl rNTPS (2.5 mM de chaque (rATP, rGTP, rCTP, rUTP)), 1µl ADN (plasmide pSP64-ZPK digéré et purifié), 1µl d'enzyme SP6 RNA polymérase et 6µl d'eau DEPC pour un volume final de 20µl. Outre le RNA Guard, toutes les solutions ainsi que l'enzyme provenaient de la compagnie Promega et la transcription s'est effectuée à 37°C pendant 60 minutes. Ensuite, la réaction a été traitée avec 1 µl de DNase I (Pharmacia) pour une période de 10 minutes à 37°C. Deux extractions au phénol/chloroforme ont par la suite été réalisées et l'ARN synthétisé *in vitro* fut précipité avec 0.5 volume d'ammonium acétate 7.5 M et 2.5 volume d'éthanol 100%. L'ARN a été resuspendu dans 20 µl d'eau DEPC et placé à -80°C jusqu'à utilisation.

La traduction a été réalisée selon le protocole provenant de la trousse « Rabbit reticulocyte lysate system » (Amersham, Life Science) qui permet la production de protéine traduite *in vitro*. 1µl d'ARNm de ZPK préparé précédemment a été combiné à 4µl de mélange de traduction (25 mM DTT, 250 mM HEPES pH 7.6, 100 mM créatine phosphate et 19 acides aminés à 312.5µM chacun), 2µl d'acétate de potassium, 1µl d'acétate de magnésium, 4µl de méthionine <sup>35</sup>S (Amersham), 20µl de lysat de réticulocyte de lapin et 18µl d'eau (sans Rnase) pour un volume final de 50µl. Toutes les solutions provenaient de la trousse sauf la radioactivité. La première étape a été de chauffer l'ARN et le 18µl d'eau pendant 10 minutes à 67°C. Par la suite, les autres composantes ont été ajoutées et la traduction s'est effectuée durant 90 minutes à 30°C. Les protéines traduites ont été conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

50µl de tampon de chargement ont été ajoutés à la préparation complète de protéines ZPK traduites *in vitro* (50µl) et chauffé durant 5 minutes à environ 90°C. Le tout a ensuite été déposé sur gel SDS-polyacrylamide en quatre fractions égales de 25µl (divisé dans 4 puits) et l'analyse de type Western fut réalisé tel que décrit précédemment.

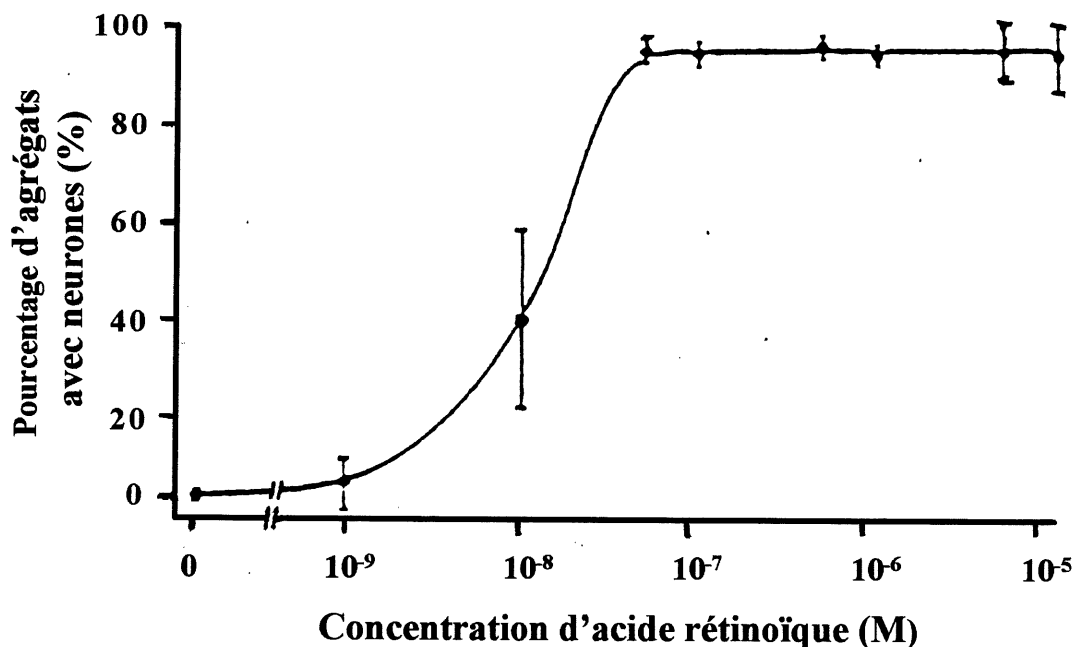
## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

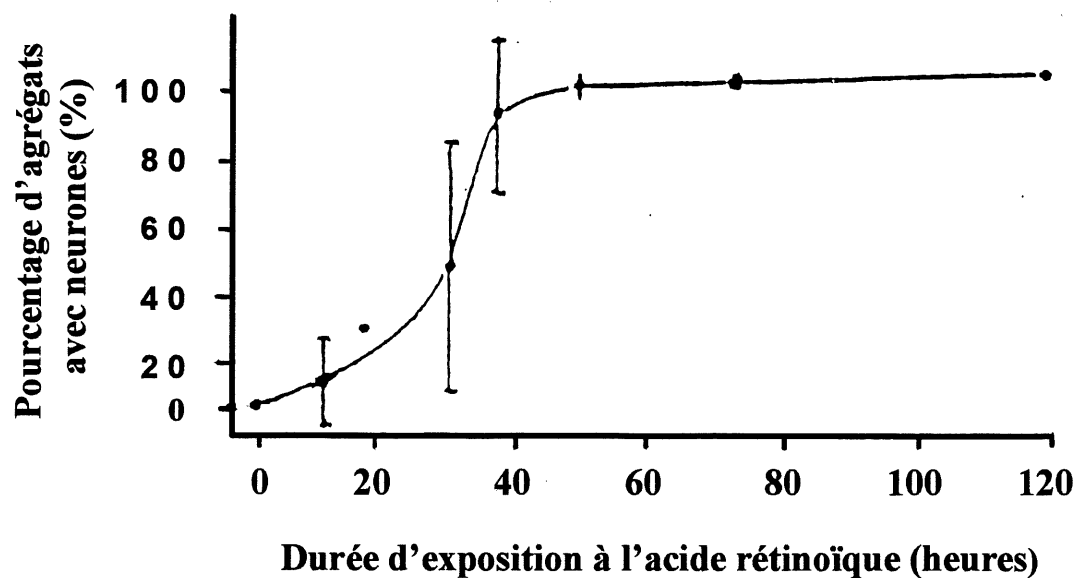
#### 3.1 Culture de la lignée de cellules P19

Les cellules EC (embryonal carcinoma) sont des cellules souches pluripotentes provenant d'un tératocarcinome de souris. Comme la différenciation de ces cellules est très similaire à celle des cellules embryonnaires normales, on peut les utiliser comme modèle pour étudier plusieurs processus du développement. La différenciation de certaines lignées de cellules EC peut se réaliser par la culture à haute densité ou par agrégation. Dans le cas des cellules EC de la lignée P19, celles-ci se différencient très faiblement lorsqu'elles sont agrégées. Par contre, si on combine agrégation et diméthylsulfoxyde (DMSO), ces cellules peuvent se différencier soit en cellules du muscle cardiaque ou du muscle squelettique, selon la concentration de DMSO utilisée. De plus, ces mêmes cellules agrégées peuvent se différencier en cellules de type neuronal si elles sont cultivées en présence d'acide rétinoïque au lieu du DMSO (Smith et al., 1987).

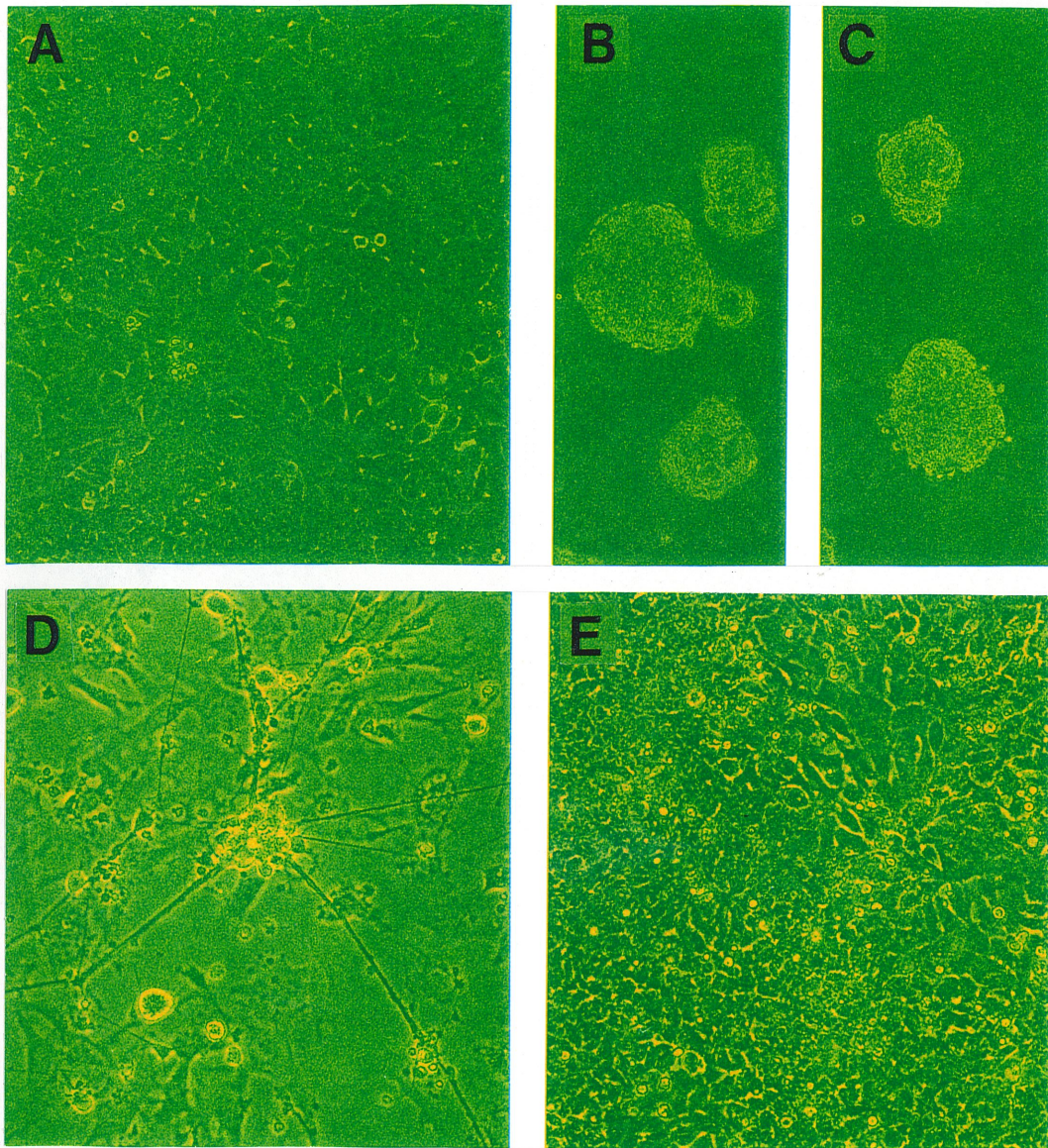
Lorsqu'on veut faire différencier les cellules P19 EC en cellules de type neuronal, on doit respecter deux facteurs importants : soit la concentration d'acide rétinoïque utilisée et la durée du traitement. Il a été démontré que pour obtenir une différenciation neuronale, on doit cultiver les cellules P19 EC en agrégats pendant une période de 4 à 5 jours en présence de  $10^{-7}$  à  $10^{-6}$  M d'acide rétinoïque (figures 11 et 12) (Jones-Villeneuve et al., 1982). À la figure 13 A, on peut observer la morphologie des cellules P19 EC qui sont cultivées en monocouche. En B et C, les cellules ont été cultivées en suspension dans un pétri bactériologique, et on peut voir les agrégats qui se sont formés spontanément. Pour démontrer l'importance de l'acide rétinoïque dans l'induction de la différenciation des cellules P19 EC, deux expériences ont été réalisées en parallèle. Ainsi, en B, les cellules agrégées ont été cultivées dans un milieu contenant  $10^{-6}$  M d'acide rétinoïque alors qu'en C, aucun agent inducteur n'a été ajouté.



**Figure 11 : Relation entre la concentration d'acide rétinoïque et la différenciation en cellules de type neuronal.** Les agrégats de cellules P19 EC, continuellement cultivés en présence de l'agent inducteur mais à différentes concentrations, ont été passés sur pétri de culture après 5 jours en suspension. 2 à 3 jours plus tard, les cultures ont été examinées pour vérifier la présence de cellules de type neuronal. Normalement, 50 agrégats ont été observés pour chaque concentration d'acide rétinoïque dans chaque expérience. Les points représentent la moyenne obtenue de 6 à 11 expériences séparées (Jones-Villeneuve et al., 1982).



**Figure 12 : Relation entre la durée d'exposition des agrégats à l'acide rétinoïque et la différenciation en cellules de type neuronal.** Une concentration de  $5 \times 10^{-7}$  M d'acide rétinoïque a été ajoutée au début de l'agrégation des cellules P19 EC, et enlevée à différents temps par trois lavage avec du milieu normal. Les agrégats ont été passés sur pétri de culture après 5 jours en suspension et examinés 2 à 3 jours plus tard pour vérifier la présence de cellules de type neuronal. Les points représentent la moyenne obtenue de 2 à 6 expériences séparées (Jones-Villeneuve et al., 1982).



**Figure 13 : Photomicrographie en contraste de phase des cellules P19.** (A) Cellules P19 non différenciées (EC) cultivées en monocouche sur pétri de culture. (B) Cellules P19 EC cultivées en agrégats pendant 4 jours avec  $10^{-6}$ M d'acide rétinoïque. (C) Cellules P19 EC cultivées en agrégats pendant 4 jours mais sans acide rétinoïque. (D) Cellules P19 agrégées avec acide rétinoïque 4 jours après le passage sur pétri de culture. (E) Cellules P19 agrégées sans acide rétinoïque 4 jours après le passage sur pétri de culture (Grossissement : A, D, E, X170, B, C, X34) (Seo et Noguchi, 1995).

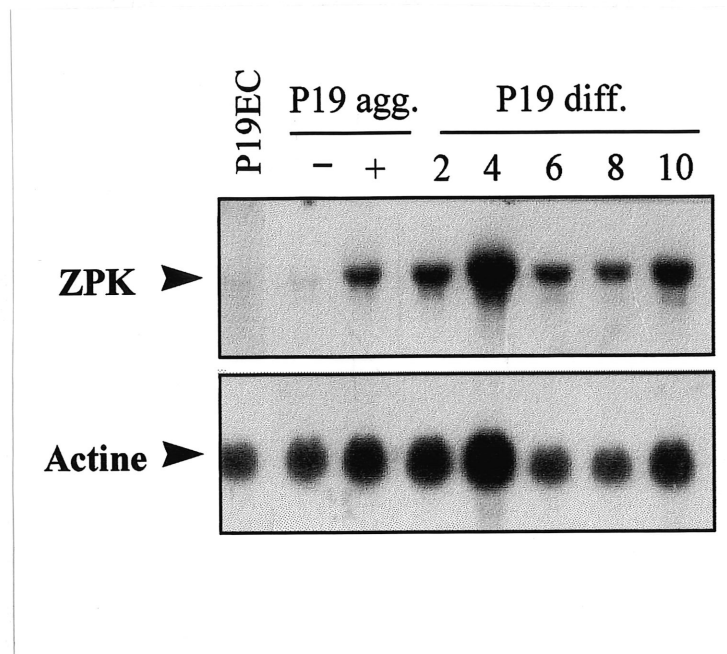


Après 4 jours d'incubation en agrégats, ceux-ci ont été dispersés et passés sur des pétris de culture dans un milieu ne contenant pas d'acide rétinoïque. Lorsqu'on observe les pétris 4 jours après le passage, on peut noter que les cellules ayant été cultivées en présence de l'agent inducteur se sont différenciées en cellules de type neuronal puisqu'elles ont maintenant des prolongements qui s'apparentent aux neurites que l'on retrouve chez les cellules nerveuses normales (figure 13 D). Par contre, chez les cellules qui ont été cultivées sans acide rétinoïque, on peut observer une morphologie identique à celle des cellules P19 EC (figure 13 E). De plus, contrairement aux cellules différenciées, ces cellules ont continué de proliférer pour atteindre un niveau très confluent. Ainsi donc, la présence de l'acide rétinoïque durant la culture des cellules P19 EC en agrégats est nécessaire pour permettre la différenciation en cellules de type neuronal.

### **3.2 Expression du gène ZPK dans les cellules P19**

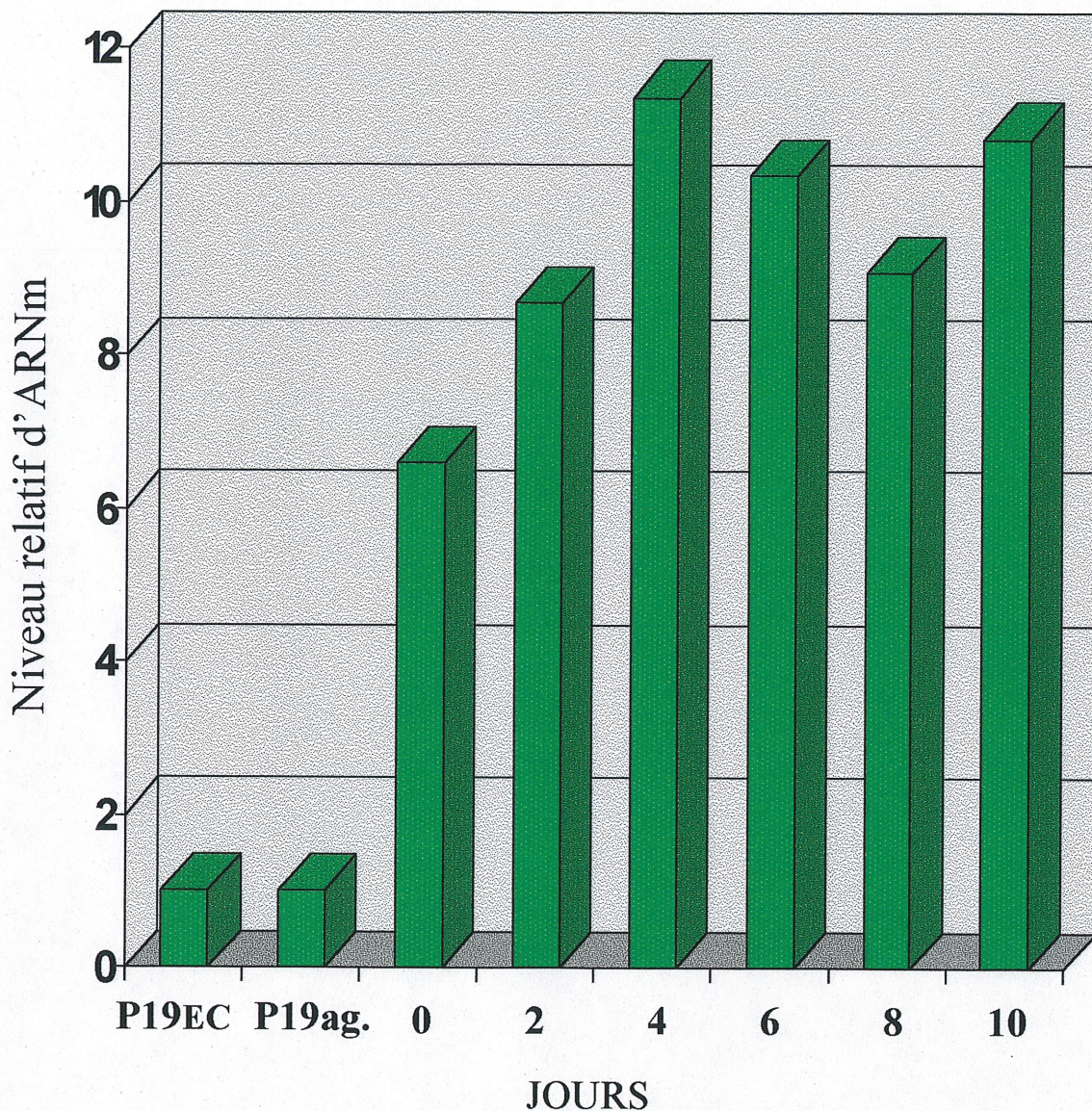
Afin d'examiner si l'expression du gène ZPK est modulée par la différenciation des cellules P19, nous avons analysé par buvardage de type Northern le niveau d'ARNm de ZPK avant et pendant la différenciation neuronale des cellules P19. La sonde utilisée fut un fragment de 1.9 kb provenant de l'ADNc de ZPK. Comme on peut voir sur la figure 14, un seul transcript d'environ 3.5 kb correspondant à ZPK a été détecté dans les cellules P19. De plus, on peut voir que le niveau d'expression du messenger de ZPK est plutôt faible dans les cellules P19 non différenciées (EC) ainsi que dans les cellules P19 qui ont été agrégées 4 jours en absence d'acide rétinoïque. Par contre, dans les cellules P19 agrégées pendant 4 jours en présence de  $10^{-6}$ M acide rétinoïque, l'expression du gène ZPK augmente de façon significative durant l'induction de la différenciation pour atteindre un maximum 4 jours après le passage des cellules P19 en culture monocouche sans agent inducteur. Par la suite, le niveau d'ARNm demeure relativement constant durant la différenciation terminale des cellules P19 pour la période de culture examinée (6, 8 et 10 jours).





**Figure 14 : Analyse de type Northern de l'expression du gène ZPK dans les cellules P19.** 20µg d'ARN total, provenant des cellules P19 non différenciées et des cellules P19 différenciées au temps indiqué, ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% et transférés sur membrane de nylon (Amersham). La membrane a été hybridée avec une sonde moléculaire marquée au  $^{32}\text{P}$  et provenant de l'ADNc de ZPK. Comme contrôle, la même membrane a ensuite été hybridée avec un fragment de la  $\beta$ -actine marqué au  $^{32}\text{P}$ . Les signes + et - indiquent la présence ou non d'acide rétinoïque pendant l'agrégation, alors que les chiffres 2, 4, 6, 8, et 10 font référence au nombre de jours suivant le passage sur pétri de culture. Cette expérience a été effectuée à trois reprises.





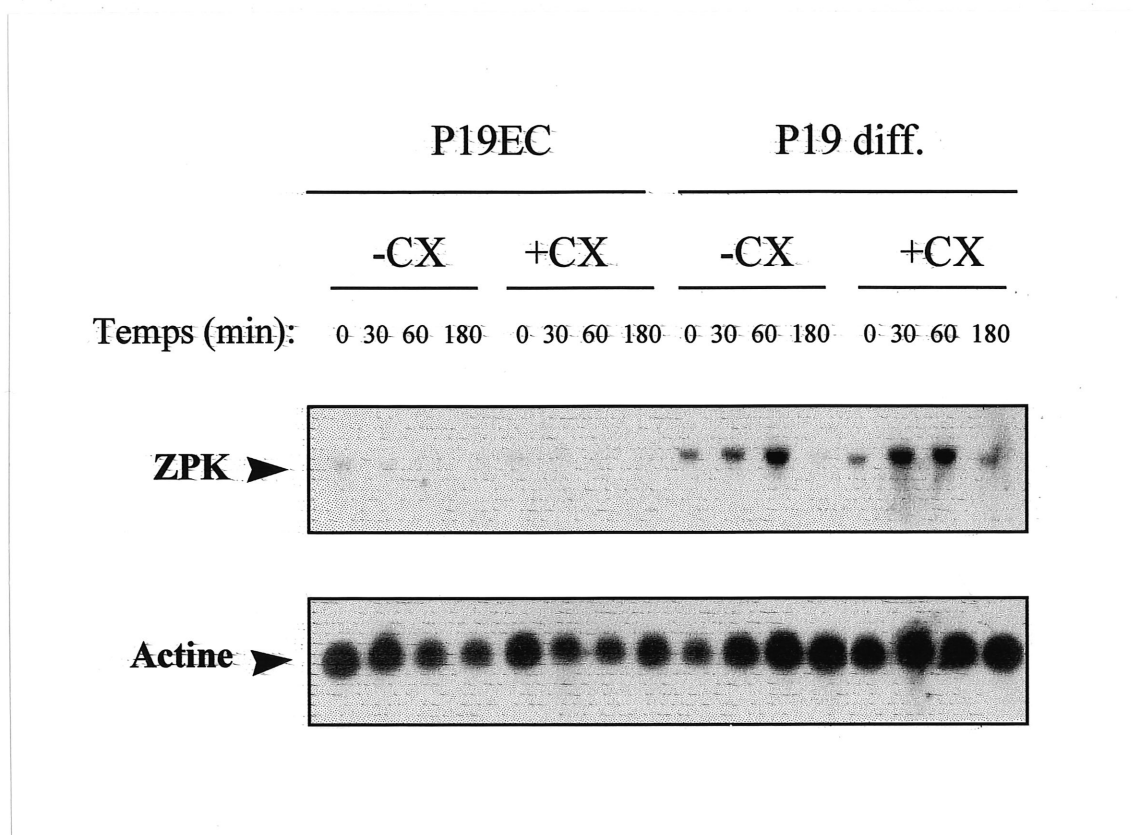
**Figure 15 : Analyse quantitative des niveaux relatifs d'ARNm de ZPK.** Les valeurs des niveaux relatifs ont été obtenues par un balayage densitométrique de l'autoradiogramme provenant de l'analyse de type Northern montrée à la figure 14. Ces valeurs correspondent aux densités optiques obtenues pour l'ARNm de ZPK normalisées avec celles obtenues pour l'ARNm de la  $\beta$ -actine. Les chiffres 0, 2, 4, 6, 8 et 10 font référence au nombre de jours suivant le passage sur pétri de culture.



Les résultats de variation du niveau d'expression du gène ZPK sont illustrés à la figure 15. Les données utilisées pour la réalisation de ce graphique proviennent d'un balayage densitométrique effectué sur l'autoradiogramme de l'analyse de type Northern. Les valeurs des niveaux relatifs correspondent aux densités optiques obtenues pour l'ARNm de ZPK qui ont été normalisées avec celles obtenues pour l'ARNm du contrôle  $\beta$ -actine. Ce graphique nous permet de mieux quantifier l'augmentation du niveau d'expression. Ainsi, on peut observer au jour 4 après le passage en culture monocouche, une augmentation de la quantité d'ARNm de ZPK dans les cellules différenciées d'environ 12 fois par rapport aux cellules P19 EC.

### **3.3 Analyse de la stabilité de l'ARNm ZPK**

Pour déterminer si l'accumulation d'ARNm ZPK durant la différenciation neuronale est due à une augmentation de la stabilité, nous avons mesuré la vitesse de dégradation dans les cellules P19 EC et les cellules P19 différenciées (4 jours agrégées en présence d'acide rétinoïque suivi par 2 jours en culture monocouche). Ainsi, la synthèse d'ARN a été bloquée avec l'actinomycine D et la vitesse de dégradation a été mesurée en présence et en absence de cycloheximide, bloqueur de synthèse protéique, en utilisant une analyse de type Northern (figure 16). Autant pour les cellules P19 EC que P19 différenciées, on a pu observer que l'ARNm de ZPK se dégradait relativement rapidement puisqu'après 180 minutes, l'ARNm a pratiquement tout disparu. Et cette observation est la même pour les deux conditions utilisées soit en présence et en absence de cycloheximide. Par conséquent, malgré l'augmentation du niveau d'ARNm de ZPK dans les cellules traitées à l'acide rétinoïque, aucune modification importante dans la stabilité cet ARNm n'est observable avant et après l'induction de la différenciation.



**Figure 16 : Analyse de la stabilité de l'ARNm ZPK dans les cellules P19.** 20µg d'ARN total, extraient des cellules P19 non différenciées et différenciées ayant subi un traitement au cycloheximide et à l'actinomycine D, ont été fractionnés par électrophorèse en gel d'agarose 1.2% et transférés sur membrane de nylon (Amersham). La membrane a été hybridée avec une sonde moléculaire marquée au  $^{32}\text{P}$  provenant de l'ADNc de ZPK. Comme contrôle, la même membrane été hybridée avec un fragment de la  $\beta$ -actine marqué au  $^{32}\text{P}$ . L'expérience a été effectuée trois fois.

### 3.4 Transcription nucléaire du gène ZPK

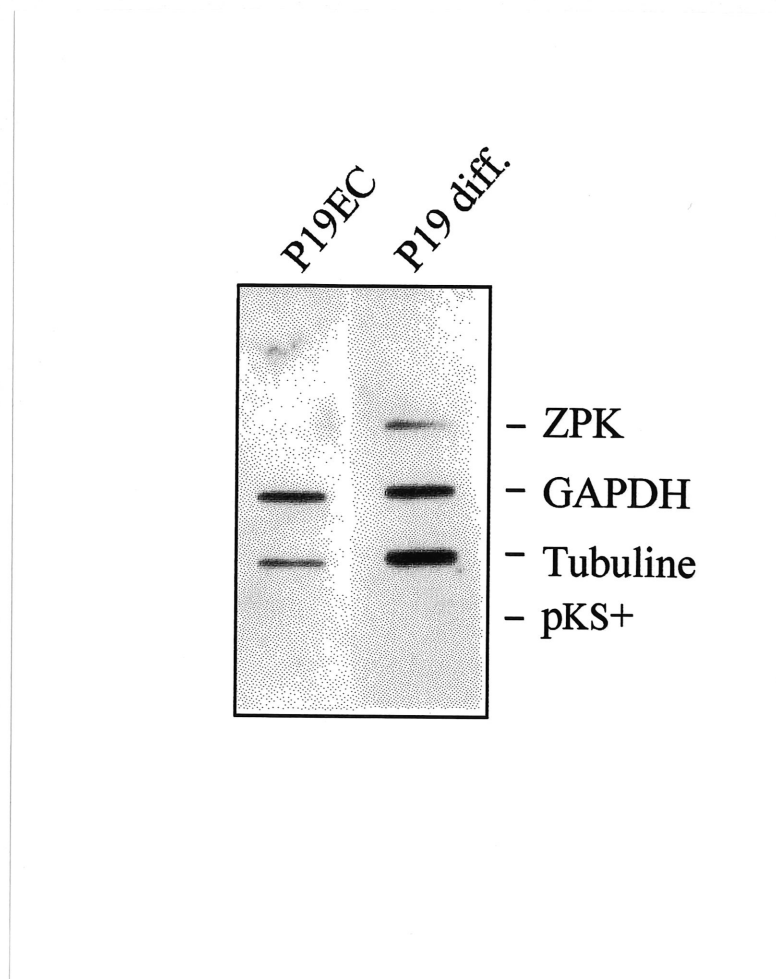
Afin de vérifier si l'augmentation du niveau d'ARNm ZPK dans les cellules P19 différenciées est reliée à une régulation transcriptionnelle, nous avons effectué une expérience de transcription nucléaire du gène ZPK. Celle-ci consiste à extraire les noyaux des cellules P19 et à les congeler le plus rapidement possible de façon à immobiliser la machinerie transcriptionnelle. Les transcrits dont la synthèse a été amorcée *in vivo*, c'est-à-dire dans les cellules P19, seront complétés *in vitro* en présence d'UTP marqué au  $^{32}\text{P}$ . La radioactivité s'incorpore donc dans les transcrits, ce qui nous permet par la suite de mesurer le niveau de transcription d'un gène, dans notre cas ZPK. Cette étude a été réalisée à la fois avec des noyaux extraits de cellules P19 EC et de cellules P19 différenciées (agrégées 4 jours avec acide rétinoïque suivi de 2 jours en culture monocouche).

Les résultats représentés à la figure 17 montrent que le niveau de transcription du gène ZPK est très faible dans les cellules P19 EC alors qu'il augmente de façon significative suite à l'induction de la différenciation par l'acide rétinoïque. À titre de comparaison et de contrôle, dans la même expérience, on a également vérifié la transcription des gènes GAPDH et tubuline. Et on peut voir que, contrairement à ZPK, l'acide rétinoïque n'a aucun effet sur le niveau de transcription du gène GAPDH et donc, il n'y a pratiquement pas de différence entre les cellules P19 EC et P19 différenciées. Ce qui n'est pas le cas pour la tubuline car il semble y avoir une certaine augmentation du niveau de transcription.

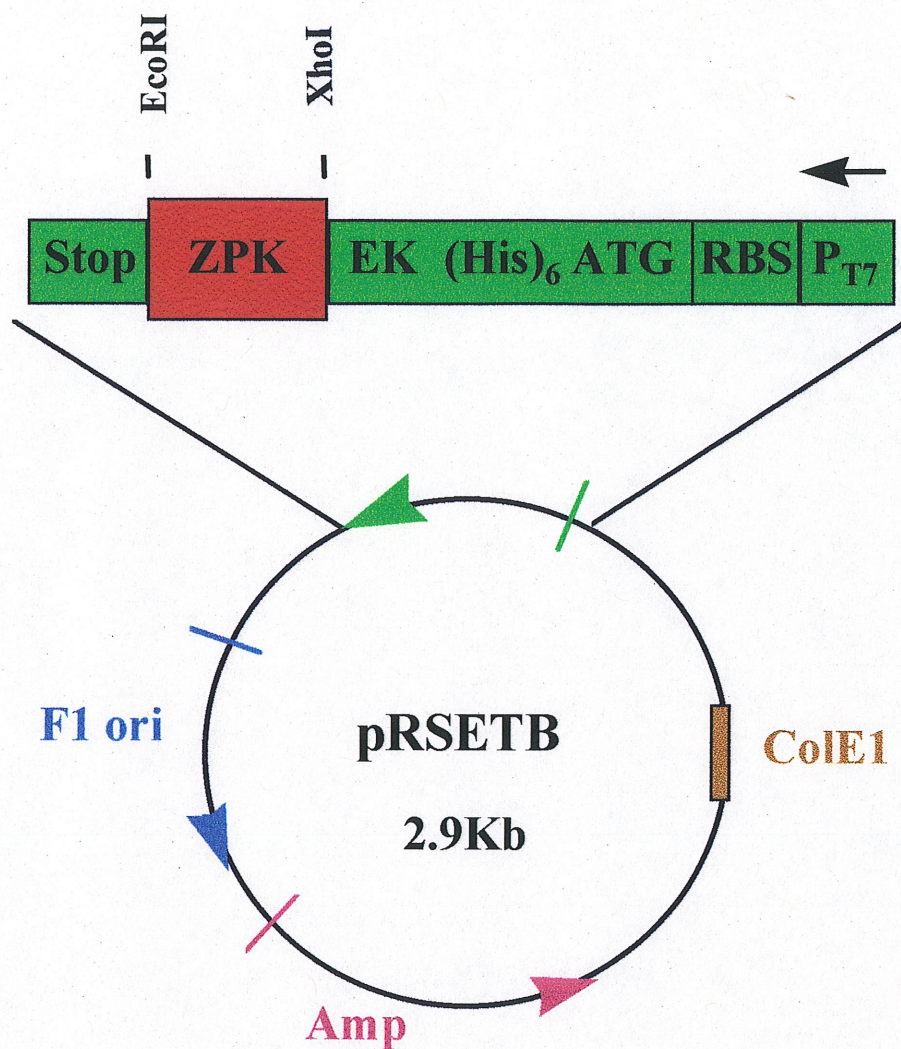
### 3.5 Production et purification d'une protéine de fusion

La deuxième partie de mon projet avait pour objectif la production d'un anticorps polyclonal anti-ZPK. Pour ce faire, une protéine de fusion comprenant une portion amino-terminale de ZPK a été produite et purifiée pour ensuite être injectée à trois lapins. Pour réaliser la production de cette protéine, une partie de l'ADNc de ZPK, correspondant au 276 premiers acides aminés, a été introduite dans le vecteur bactérien pRSET B (figure 18).





**Figure 17 : Transcription nucléaire du gène ZPK dans les cellules P19.** Les noyaux ont été extraits de cellules P19 non différenciées et différenciées et incubés en présence d' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  UTP dans des conditions qui favorisent l'élongation des transcrits naissants. Un compte équivalent d'ARN nucléaires marqués au  $^{32}\text{P}$  ont été hybridés à des plasmides dénaturés et immobilisés sur membrane de nylon (Amersham). Les plasmides contenaient soit l'ADNc de ZPK, de la GAPDH ou de la tubuline. Le plasmide KS+ a été utilisé comme contrôle pour l'hybridation non spécifique. L'expérience a été effectuée deux fois.



**Figure 18 : Construction d'une protéine de fusion bactérienne.** Le fragment *XhoI-EcoRI* provenant de l'ADNc de ZPK et qui correspond à 276 acides aminés de la portion aminoterminale, a été introduit dans les sites *XhoI-EcoRI* du vecteur d'expression bactérien pRSET B. Le vecteur pRSETB-ZPK a été amplifié dans la bactérie *E.Coli* DH5 $\alpha$ .



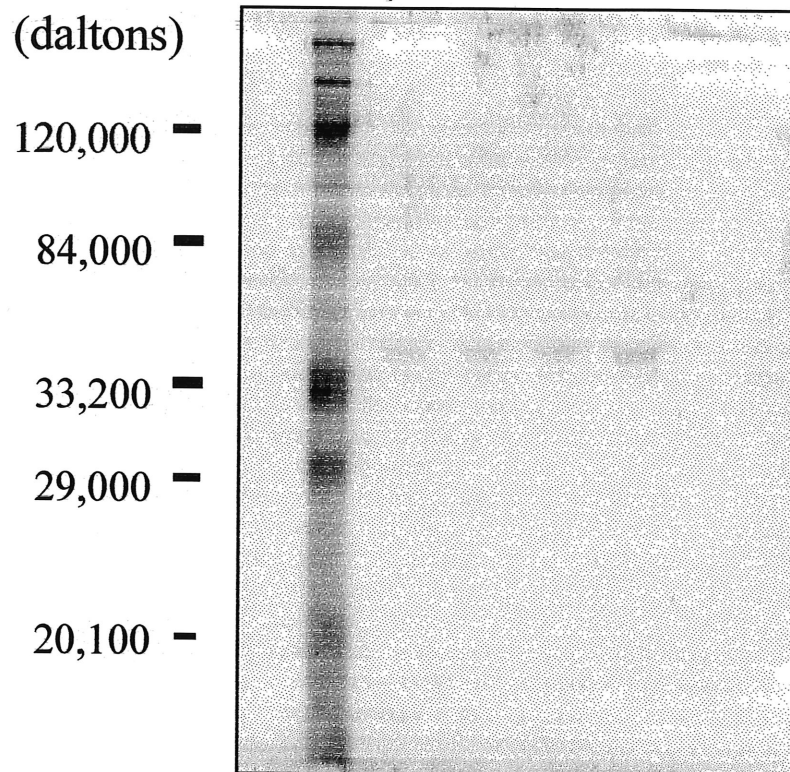
Ce vecteur d'expression comprend : un site de clonage multiple, dans lequel nous avons cloné la portion de ZPK en utilisant les sites *EcoRI* et *XhoI*, un site de coupure pour l'entérokinase (EK), une séquence codant 6 histidines ((His)<sub>6</sub>) et un site d'attachement aux ribosomes de *E.Coli* (RBS). On retrouve aussi dans ce vecteur deux origines de répllication : une de *E.Coli* (colE1) et une autre du bactériophage f1 (F1 ori). Finalement, pRSET B contient un gène de résistance à l'ampicilline et le promoteur du bactériophage T7 (P<sub>T7</sub>). Dans ce vecteur, la portion de ZPK se trouve précédé de la région polyhistidine qui permet la purification subséquente de la protéine de fusion ZPK-(His)<sub>6</sub> produite dans la bactérie *E.Coli* BL-21.

Après sa production, la protéine ZPK fusionné a été purifiée sur colonne de nickel. Pour procéder à cette purification, on a d'abord lysé les BL-21 pour libérer notre protéine de fusion, et on a déposé le lysat sur une colonne de résine chargée au chlorure de nickel (NiCl). Comme la région polyhistidine possède une affinité pour le nickel, la protéine ZPK-(His)<sub>6</sub> est restée accrochée à la colonne alors que les autres protéines du lysat n'ont pas été retenues. On termine en éluant la protéine de fusion et on obtient ainsi une protéine purifiée prête à être injectée à des lapins pour faire produire un anticorps anti-ZPK. Les protéines ZPK-(His)<sub>6</sub> de quatre colonies provenant de la transformation du vecteur pRSETB-ZPK dans la souche *E.Coli* BL-21 ont été produits et purifiés. Suite à la purification, les quatre protéines de fusion ont été analysées sur gel SDS-polyacrylamide (figure 19). Une seule protéine d'environ 35 kda, correspondant à ZPK-(His)<sub>6</sub>, apparaît sur le gel et ce, pour les tous clones utilisés.

### **3.6 Production d'un anticorps anti-ZPK**

#### **3.6.1 Analyse de type Western sur la protéine de fusion**

Après la production et la purification de la protéine de fusion ZPK-(His)<sub>6</sub>, celle-ci a été injectée de façon sous-cutanée et intramusculaire à trois lapins. Huit semaines après l'injection de cette protéine, le sérum a été recueilli. Pour vérifier la production de l'anticorps, une



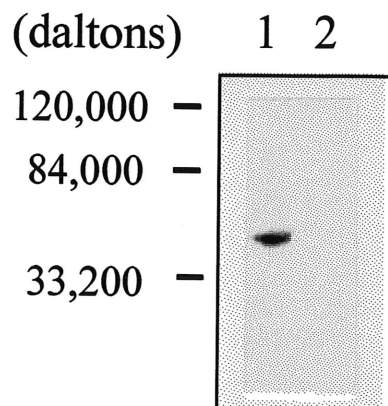
**Figure 19 : Analyse sur gel SDS-PAGE de la protéine de fusion bactérienne ZPK-(His)<sub>6</sub>.** Après transformation du vecteur pRSETB-ZPK dans la souche *E.Coli* BL-21, quatre clones ont été sélectionnés pour la production et la purification sur colonne de nickel de la protéine ZPK-(His)<sub>6</sub>. Environ 20µg de protéines de fusion purifiées ont été déposées sur gel SDS-polyacrylamide. Suite à la migration, le gel a été à la fois coloré et fixé dans du bleu de Coomassie puis décoloré avant d'être séché. Le poids moléculaire (PM) de la protéine ZPK-(His)<sub>6</sub> est d'environ 35 KDa et les standards de PM sont montrés à gauche.

analyse de type Western a été effectuée sur la protéine de fusion utilisée pour l'immunisation. On peut voir à la figure 20, un signal unique à environ 35 KDa qui indique que l'anticorps produit chez le lapin reconnaît bien la protéine de fusion ZPK-(His)<sub>6</sub> (ligne 1). De plus, la production a été assez efficace puisque le titre utilisé pour l'analyse Western était de 1:250 000. Dans le contrôle, réalisé avec le sérum préimmun, aucun signal n'est détecté (ligne 2).

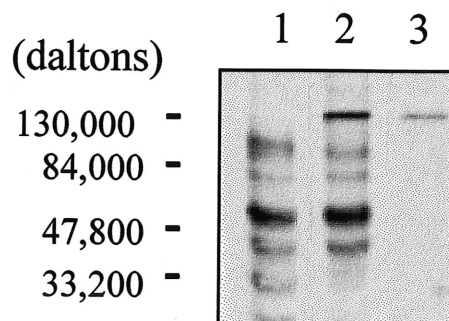
### 3.6.2 Analyse de type Western sur la protéine ZPK traduite *in vitro*

Pour s'assurer que l'anticorps reconnaît bien la protéine ZPK complète, une analyse de type Western a été réalisée sur la protéine ZPK traduite *in vitro* et marquée au <sup>35</sup>S (figure 21). Un signal a pu être détecté à environ 130 KDa sur la membrane qui a réagi avec le sérum contenant l'anti-ZPK (ligne 2). Par contre, ce même signal n'apparaît pas dans le contrôle fait avec le sérum préimmun de lapin (ligne 1). On peut aussi voir, après exposition de la membrane toute la nuit, que la protéine ZPK traduite *in vitro* à un PM d'environ 130 KDa (ligne 3).





**Figure 20 : Analyse de type Western avec l'anticorps anti-ZPK sur la protéine de fusion ZPK-(His)<sub>6</sub>.** Comme décrit dans la section matériels et méthodes, un anticorps anti-ZPK lapin a été produit contre une protéine de fusion contenant 276 acides aminés de la portion amino-terminale de ZPK. Environ 5-10µg de cette protéine de fusion ZPK-(His)<sub>6</sub> ont été séparé par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide, transférés sur membrane PVDF (Amersham), et incubés avec le sérum de lapin contenant l'anti-ZPK (1) ou avec le sérum préimmun de lapin (2). La révélation a été effectuée avec un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de lapin qui est couplé à une peroxydase pour permettre la détection avec le système ECL (Amersham). Après l'ajout du substrat sur la membrane, celle-ci a été révélée par autoradiographie à l'aide d'un film Kodak (Biomax MS) pour une durée approximative de 30 secondes. Les standards de PM sont montrés à gauche et cette expérience a été effectuée deux fois.



**Figure 21 : Analyse de type Western avec l'anticorps anti-ZPK sur la protéine ZPK traduite *in vitro*.** Une réaction complète de protéines ZPK traduites *in vitro*, et marquées à la méthionine  $^{35}\text{S}$ , a été divisée de façon égale dans quatre puits. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide puis transférées sur membrane PVDF (Amersham). Cette dernière a par la suite été incubée avec le sérum préimmun de lapin (1) ou avec le sérum de lapin contenant l'anti-ZPK (2). La révélation a été réalisée de façon analogue à ce qui a été décrit précédemment. Après l'ajout du substrat, la membrane a été révélée par autoradiographie à l'aide d'un film Kodak (Biomax MS) pour une durée d'environ 10 minutes. Comme référence, on retrouve à droite (3) la protéine ZPK marquée au  $^{35}\text{S}$  qui a été exposée toute la nuit à un film Kodak (Biomax MS) et les standards de PM sont montrés à gauche. L'expérience a été effectuée deux fois.

## **CHAPITRE 4**

### **DISCUSSION**

La différenciation cellulaire constitue l'un des processus les plus étudiés en biologie cellulaire. En effet, son évolution au cours du développement embryonnaire et ses modifications en relation avec certaines maladies telles que le cancer ont créé un intérêt grandissant auprès des chercheurs. Le phénomène de différenciation cellulaire est très complexe car il fait intervenir un nombre incroyable de protéines différentes dont plusieurs d'entre elles sont des protéines kinases. Au cours des dernières années, plusieurs groupes de recherche ont procédé à l'identification d'un grand nombre de nouvelles protéines kinases. La protéine serine/thréonine kinase ZPK en fait partie.

Jusqu'à maintenant, on a pu déterminer que le gène codant ZPK est exprimé dans des populations de cellules spécifiques qui ont atteint un stade de différenciation terminale ou qui sont en voie de se différencier. En outre, le cerveau correspond au tissu où ce gène est le plus fortement exprimé. Par conséquent, afin de poursuivre dans la même direction, j'ai étudié l'expression du gène ZPK au cours de la différenciation neuronale de la lignée de cellules P19. Et dans un autre ordre d'idée, le second objectif de mon projet visait la production d'un outil indispensable pour le laboratoire, soit un anticorps anti-ZPK.

#### **4.1 Expression de ZPK dans les cellules P19**

La première partie de mon projet consistait à vérifier si l'expression du gène ZPK est reliée au processus de différenciation en utilisant un modèle cellulaire pouvant se différencier en cellules nerveuses. Pour ce faire, j'ai mesuré le niveau d'ARNm de ZPK avant et pendant la différenciation de la lignée de cellules pluripotentes P19. Pour faire un rappel, ces cellules proviennent d'un carcinome embryonnaire (EC) de souris et peuvent être induites à se



différencier en cellules de type neuronal lorsqu'elles sont cultivées, pour une période de 4 jours, en agrégats dans un pétri bactériologique et en présence d'acide rétinoïque. Par la suite, les agrégats sont dissociés en une suspension de cellules qui est alors passée sur des pétris de culture pour une période additionnelle de 2 à 10 jours afin de permettre la différenciation terminale et ce, en absence d'acide rétinoïque.

Les ARNs totaux ont donc été extraits des cellules P19 non différenciées, des agrégats de cellules P19 cultivés avec et sans acide rétinoïque, ainsi que des cellules P19 différenciées à différents temps après leur passage sur pétris de culture. Ces ARNs ont été analysés par buvardage de type Northern et les résultats obtenus ont montré une augmentation du niveau d'ARNm de ZPK suite à l'induction de la différenciation neuronale des cellules P19. De plus, ce niveau atteint son maximum 4 jours après le passage sur pétri de culture et demeure à peu près constant pour le reste de la période de culture étudiée.

Il est important de noter que l'augmentation de l'expression du gène ZPK est bien reliée à la différenciation cellulaire induite par le traitement des cellules P19 à l'acide rétinoïque et non à la période de culture en suspension. En effet, on observe aucune augmentation du niveau d'ARNm de ZPK dans les cellules P19 ayant été cultivées 4 jours en suspension mais en absence de l'agent inducteur.

En effectuant une analyse densitométrique de l'autoradiogramme provenant de l'analyse Northern réalisée précédemment, il a été possible de quantifier de façon approximative l'augmentation du niveau d'ARNm de ZPK observée au cours de la différenciation neuronale des cellules P19. Ainsi, au niveau maximum, soit 4 jours après le passage sur pétri de culture, on obtient une augmentation d'environ 12 fois par rapport au niveau d'ARNm retrouvé dans les cellules P19 non différenciées (EC).

Dans cette première partie, je devais également déterminer à quel niveau se situe la régulation de l'expression du gène ZPK : transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Pour répondre à cette question, j'ai d'abord effectué une analyse de la stabilité de l'ARNm de ZPK. Cette stabilité a été mesurée à la fois dans les cellules P19 non différenciées et dans les cellules P19 différenciées (agrégées 4 jours avec acide rétinoïque suivi de 2 jours en culture monocouche). La synthèse d'ARNm a été interrompue avec de l'actinomycine D, qui bloque la transcription par l'ARN polymérase II, et la vitesse de dégradation a été étudiée en présence et en absence de cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique. Les ARNs totaux ont été extraits à différents temps après l'ajout d'actinomycine D et analysés par buvardage de type Northern.

Les résultats obtenus ont montré que le profil de dégradation de l'ARNm de ZPK est très similaire pour les cellules P19 différenciées et non différenciées, et que cet ARNm est pratiquement tout dégradé après environ 180 minutes de traitement à l'actinomycine D. On a aussi pu noter une certaine augmentation du niveau d'ARNm entre les temps 0 et 60 minutes pour l'expérience effectuée avec les cellules P19 différenciées. Mais si on regarde les différents niveaux d'actine, qui permettent de comparer les quantités d'ARNs déposées dans le gel, on s'aperçoit que cette augmentation est plus une conséquence d'une variation dans les quantités d'ARNs utilisées que celle d'une hausse du niveau d'expression de ZPK. Par contre, lorsqu'on compare les niveaux d'actine des temps 60 et 180 minutes de cette même expérience, on peut remarquer que ceux-ci sont pratiquement égaux. Ainsi, il y a réellement disparition de l'ARNm de ZPK entre ces deux temps, ce qui nous permet d'affirmer que cet ARNm est bel et bien dégradé après 180 minutes.

Selon ce résultat, on peut penser que la différence observée dans le niveau d'ARNm de ZPK entre les cellules P19 non différenciées et différenciées est attribuable à une augmentation de la transcription du gène ZPK. Pour vérifier cette hypothèse, une expérience de transcription nucléaire a été réalisée avec des noyaux extraits de cellules P19 non différenciées et différenciées (agrégées 4 jours avec acide rétinoïque suivi de 2 jours en culture monocouche).

On a pu observer, par cette expérience, que le niveau de transcription du gène ZPK est très faible dans les cellules P19 non différenciées alors qu'il augmente de façon significative dans les cellules P19 différenciées. Cette hausse du niveau d'ARNm de ZPK est bien reliée à une augmentation de transcription car, si on regarde le contrôle effectué avec le gène de la GAPDH, on peut observer un niveau d'expression à peu près égal entre les cellules P19EC et les cellules P19 différenciées. Ce qui démontre que nous avons utilisé une quantité sensiblement équivalente d'ARNm marqué au  $^{32}\text{P}$  provenant des cellules P19 non différenciées et différenciées.

Pour ce qui est du contrôle réalisé avec le gène de la tubuline, on a vu qu'il semblait y avoir une augmentation de transcription suite à la différenciation neuronale des cellules P19. Ce qui veut dire que l'utilisation du gène de la tubuline comme contrôle n'était peut-être pas adéquat pour cette expérience. Le fait d'avoir employé deux contrôles nous a permis de contrer la possibilité d'avoir une variation du niveau de transcription dans le contrôle choisi, comme ce fut le cas pour le gène de la tubuline. L'important pour nous était d'avoir au moins un contrôle qui soit valable, et c'est ce que nous avons obtenu avec la GAPDH. Par conséquent, nous pouvons dire que l'augmentation du niveau de transcription du gène ZPK est réellement rattachée à la différenciation neuronale des cellules P19 et non à une variation dans les quantités d'échantillons utilisées.

Analysées conjointement, ces deux expériences indiquent clairement que l'augmentation du niveau d'ARNm de ZPK, observée durant la différenciation neuronale des cellules P19, est régulée de façon transcriptionnelle et non post-transcriptionnelle. ZPK n'est pas la seule protéine kinase à être régulée de façon transcriptionnelle. Webster et al. (1993) a démontré que dans les cellules épithéliales, la protéine sérine/thréonine kinase *sgk* répond aux hormones glucocorticoïdes et au sérum en augmentant son taux de transcription.



Les résultats de mes études dans les cellules P19 ont donc montré une augmentation significative du niveau d'expression, soit d'environ 12 fois, suite à la différenciation neuronale de ces cellules. Ainsi, on peut dire que ces résultats sont en accord avec les résultats de nos expériences d'hybridation *in situ* et supportent clairement un rôle pour la protéine kinase ZPK dans la différenciation cellulaire. En outre, ces résultats sont également en accord avec l'observation que Reddy et Pleasure ont fait lors du clonage de leur protéine soit, l'augmentation du niveau d'ARNm de ZPK humain suite à la différenciation en neurone des cellules humaines NT2, par un traitement à l'acide rétinoïque (Reddy et Pleasure, 1994). D'ailleurs, suite à leurs études, ce groupe a suggéré que ZPK a certainement un rôle à jouer dans la différenciation neuronale.

La protéine kinase ZPK n'est pas la seule à être fortement exprimée au niveau du cerveau et à être reliée à la différenciation cellulaire. En effet, Howell et al. (1991) ont trouvé un haut niveau d'expression de la protéine kinase CLK dans ce même tissu. Ils ont également observé que la différenciation des cellules P19 en cellules de type neuronal était accompagnée d'une augmentation du niveau d'ARNm de CLK (Howell et al., 1991). La protéine sérine/thréonine kinase CDK5 est aussi exprimée plus fortement dans le cerveau que dans tout autre tissu. Et plus spécifiquement, l'expression de cette protéine est localisée dans les neurones qui ont atteint leur stade de différenciation terminale (Ino et al., 1994).

Bien qu'à ce stade-ci de nos recherches, nous pouvons soutenir que la protéine kinase ZPK soit impliquée dans le processus de différenciation cellulaire, il reste que nous ne connaissons pas encore son rôle exact. La question qui se pose à ce moment-ci c'est de savoir à quel niveau ZPK intervient-il exactement dans la différenciation puisque ce processus complexe est normalement constitué de plusieurs étapes. Les plus importantes sont l'arrêt de la croissance, l'induction de la différenciation et le maintien de l'état différencié.

Étant donné que l'expression de ZPK apparaît très rapidement au cours de l'induction de la différenciation des cellules P19 par l'acide rétinoïque et qu'en plus, il a été démontré que

ZPK exerce une action négative sur la prolifération des cellules NIH 3T3 lorsqu'il y est surexprimé (Bergeron et al., 1997), il serait peut-être justifié de croire davantage à une implication de cette protéine dans le contrôle de la prolifération. Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par le fait que DLK et MUK, les homologues de ZPK, sont capables d'activer la voie de JNK/SAPK. En effet, on a vu dans l'introduction que le groupe de Holzman a montré que DLK pouvait activer p46<sup>SAPK</sup> de la voie JNK/SAPK (Fan et al., 1996). Et on a également parlé de MUK, la version rat de ZPK cloné par Hirai, qui peut activer la voie JNK/SAPK de façon similaire à MEKK (Hirai et al., 1996). Comme on le sait, l'activation de la voie JNK/SAPK conduit souvent à l'arrêt de prolifération. Ces résultats viennent donc appuyer la possibilité que ZPK soit impliqué dans l'étape qui précède la différenciation cellulaire, c'est-à-dire l'arrêt de la croissance. Mais encore là, rien n'empêche le fait que ZPK puisse exercer des rôles différents selon le type de cellules, comme on a pu le constater avec ERK qui peut soit déclencher la prolifération dans les cellules fibroblastiques ou la différenciation dans les cellules PC12 (Marshall, 1995). Toutefois, en ce qui concerne la différenciation neuronale des cellules P19, je pense que notre protéine ZPK est impliquée dans l'arrêt de prolifération qui précède la différenciation pour les raisons mentionnées précédemment.

#### **4.2 Production d'un anticorps**

Les expériences décrites auparavant ne sont certes pas les seules approches utilisées en recherche pour déterminer la fonction d'une protéine. Une grande diversité d'études peuvent être réalisées par l'emploi d'un anticorps. Mais comme cet outil n'existait pas encore dans notre laboratoire, il a donc constitué l'objectif de la deuxième partie de mon projet, soit de produire un anti-ZPK possédant une bonne spécificité.

Rappelons brièvement que pour cette partie de mon projet, une protéine de fusion constituée des 276 acides aminés de l'extrémité amino-terminale de ZPK et d'une séquence de 6 histidines a été produite dans la bactérie hôte E.Coli BL-21 puis purifiée sur une colonne de résine chargée au chlorure de nickel. L'analyse sur gel par électrophorèse a montré une bande

unique à environ 35 KDa correspondant à la protéine de fusion purifiée. Celle-ci a ensuite été injectée à des lapins pour la production d'un anticorps dirigé contre la portion amino-terminale de ZPK. Les anticorps anti-ZPK produits ont été recueillis après 8 semaines d'immunisation par exsanguination. Pour vérifier la spécificité de l'anticorps, une analyse de type Western a d'abord été effectuée sur la protéine de fusion. Le résultat a montré une forte reconnaissance de l'anti-ZPK pour la protéine injectée et une bonne spécificité. En outre, le titre obtenu s'est avéré particulièrement bon puisque l'unique signal perçu était très évident même pour une dilution de 1 dans 250 000.

La deuxième étape fut de refaire la même expérience mais en utilisant cette fois-ci la protéine ZPK complète traduite *in vitro* en présence de méthionine  $^{35}\text{S}$ . Comme résultat, on a pu observer un signal à 130 KDa correspondant à la protéine ZPK traduite et qui n'était pas présent dans le contrôle. Étant donné que la protéine traduite était marquée au  $^{35}\text{S}$ , on a exposé la membrane pendant toute la nuit pour comparer le signal obtenu avec l'anticorps avec celui engendré par le  $^{35}\text{S}$ . La comparaison des deux autoradiogrammes a démontré que le signal détecté à 130 KDa par l'anti-ZPK correspondait effectivement à la protéine ZPK traduite *in vitro*. Ainsi, l'anticorps anti-ZPK reconnaît très bien la protéine ZPK. Mais ce qu'on peut observer en plus sur cette analyse de type Western, c'est la présence de plusieurs autres bandes qu'on n'avait pas vu dans l'expérience précédente avec la protéine de fusion.

Pour expliquer la présence de ces autres signaux, il faut d'abord se rappeler qu'on a utilisé des réticulocytes de lapin pour traduire la protéine ZPK *in vitro*. Par conséquent, en plus de notre protéine traduite, on retrouvait dans le mélange de traduction des protéines provenant du lysat de réticulocytes. Il se peut que parmi ces protéines, il y ait eu la présence d'immunoglobulines de la classe IgG. Après électrophorèse et transfert, ces protéines ont pu être reconnues par l'anticorps secondaire puisque celui-ci est dirigé contre les IgG de lapin. Il serait donc plausible de penser que les nombreuses réactions croisées observées pourraient être reliées à une reconnaissance d'immunoglobulines de classe IgG, provenant du lysat de réticulocytes, par le deuxième anticorps. De plus, on peut aussi confirmer que le signal à 130



KDa correspond bien à la protéine ZPK par le fait que le patron de bandes, provenant de réactions croisées, est le même pour le sérum préimmun (contrôle) et le sérum contenant l'anti-ZPK. Par contre, la bande à 130 KDa ne se retrouve que dans l'échantillon renfermant l'anti-ZPK et non dans le contrôle.

Ainsi, avec les premiers résultats obtenus sur la caractérisation de l'anticorps anti-ZPK, on peut croire à la bonne spécificité de celui-ci pour notre protéine. Évidemment, plusieurs autres expériences peuvent être réalisées pour confirmer la spécificité de notre anticorps. Par exemple, des extraits de cellules de souris pourraient être analysés par buvardage Western avec notre anticorps. Nous pourrions aussi transfecter l'ADNc de la protéine ZPK dans des cellules en culture et procéder à une analyse Western de ces cellules avec l'anti-ZPK. Jusqu'à maintenant, quelques expériences de buvardage Western et d'immunoprécipitation ont été réalisées dans le laboratoire sur des cellules transfectées avec l'ADNc de ZPK et les résultats obtenus ont montré une bonne spécificité de l'anticorps (résultats non présentés).

Dans l'introduction, on a vu que Holzman avait réussi à obtenir un excellent anticorps polyclonal pour leur protéine DLK à partir du lapin (Holzman et al., 1994). En utilisant la même approche qu'eux, soit celle d'une protéine de fusion bactérienne comprenant environ 250 acides aminés de notre protéine, et le même organisme pour produire l'anticorps, nous avons bon espoir d'obtenir, à notre tour, un anticorps spécifique pour notre protéine ZPK. Les résultats qui ont été présentés précédemment et ceux réalisés un peu plus tard dans le laboratoire montrent clairement que nous avons atteint notre objectif, soit celui de produire un anticorps dirigé contre notre protéine ZPK, possédant un bon titre et surtout, une bonne spécificité.

#### **4.3 Utilisation de l'anticorps dans la poursuite immédiate du projet**

Afin de compléter l'étude de l'expression du gène ZPK dans la lignée de cellule P19, il serait intéressant d'effectuer quelques expériences faisant appel à l'anticorps. Premièrement, on

pourrait mesurer l'expression de la protéine avant et après l'induction de la différenciation des cellules P19 dans le but de vérifier la corrélation existant entre la présence de l'ARNm et de la protéine. Pour se faire, des analyses de type Western seraient réalisés avec l'anti-ZPK sur des extraits de protéines préparés avant et après le traitement des cellules P19 à l'acide rétinoïque. De plus, la réalisation d'une expérience d'immunohistochimie sur des cellules P19 non différenciées et différenciées permettrait la visualisation et la localisation de la protéine dans la cellule. L'immunohistochimie permettrait aussi du même coup de confirmer que la protéine ZPK se trouve bel et bien dans les cellules différenciées possédant un phénotype de cellules neuronales.

Finalement, pour compléter cette étude, il serait pertinent de vérifier l'activité de la protéine ZPK dans les cellules P19. Pour ce faire, des expériences d'immunoprécipitation seraient réalisés sur des lysats provenant des cellules P19 différenciées et ensuite, le culot de protéines immunoprécipitées serait utilisé pour des mesures de l'activité kinase *in vitro*.

#### **4.4 Perspectives d'avenir**

Dans le but de poursuivre les expériences réalisées dans la première partie de mon projet, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur le rôle que ZPK exerce dans la différenciation cellulaire en utilisant l'une des approches mentionnées dans l'introduction. Celle-ci consisterait à transfecter l'ADNc de notre protéine dans une lignée de cellule afin d'obtenir des transfectants stables. Ces cellules devraient bien entendu pouvoir se différencier comme dans le cas des cellules P19. Pour réaliser cette expérience, on pourrait utiliser un vecteur inducible pour les raisons suivantes : ce vecteur permet d'une part de pouvoir moduler l'expression de ZPK en tout temps, ce qui est avantageux par rapport à un vecteur qui ne permettrait qu'une expression constitutive. D'autre part, comme ZPK inhibe la prolifération, il serait pratiquement impossible d'obtenir des transfectants stables avec un vecteur à expression constitutive. Par contre, l'utilisation d'un vecteur inducible offrirait la possibilité de moduler le niveau d'expression dans les cellules en fonction de la présence ou de l'absence d'un agent

inducteur. Il existe de nombreux types de vecteurs inductibles dont ceux utilisant le promoteur MMTV (mouse mammary tumor virus). L'un des problèmes majeurs avec ce type de promoteur, c'est qu'on doit l'induire avec des glucocorticoïdes. Or si les cellules utilisées ne possèdent pas de récepteurs aux glucocorticoïdes, il faut alors procéder à la cotransfection d'un vecteur contenant le gène d'intérêt placé sous le contrôle du promoteur MMTV et d'un vecteur dans lequel est cloné le récepteur requis (Miller et Rizzino, 1995).

Un autre système pourrait aussi être utilisé, soit celui du répresseur *tet* (tétracycline). Dans ce système, on retrouve un transactivateur (tTA) capable de lier un opérateur *tet* situé à environ 70 pb en amont du site d'initiation de la transcription. En présence de tétracycline, il n'y a pas de transcription car celle-ci se fixe au transactivateur et empêche ce dernier de lier l'opérateur *tet*. Par contre, en absence de tétracycline le phénomène inverse se produit permettant ainsi la transcription de notre gène. Bien que ce système de vecteur inductible soit efficace, il demeure néanmoins qu'il demande également la cotransfection du vecteur pUHD15-1neo, contenant le transactivateur (tTA), avec le pUHD 10-3, dans lequel se retrouve cloné le gène d'intérêt avec les sept opérateurs *tet* (Miller et Rizzino, 1995) (Gossen et al., 1994). Comme on le sait, la réussite d'une cotransfection peut parfois nécessiter de la patience et de la persévérance.

Une lignée de cellules souvent utilisée pour les expériences de transfection est la lignée PC12. Par exemple, Myers et al. (1994) ont démontré, par l'utilisation de cette méthode, l'implication de la protéine kinase CLK dans la différenciation. L'ADNc de CLK, une protéine kinase à double spécificité, a été introduit dans les cellules PC12 et des transfectants stables ont été obtenus. Suite à l'expression de CLK dans ces cellules, il y a eu différenciation comme si elles avaient été traitées avec leur agent inducteur, soit le NGF (Myers et al., 1994). Parmi les autres types cellulaires pouvant aussi être sélectionnées pour ce genre d'étude, citons les cellules P19 et aussi les cellules U-937 puisque ces dernières ont déjà été utilisées pour l'étude du rôle de la protéine kinase C dans la différenciation (Ways et al., 1994).



Dans notre cas, je crois que la lignée de cellule PC12 serait un bon choix étant donné sa grande utilisation pour ce type d'expériences et qu'en plus, nous savons que le gène ZPK y est exprimé. En parallèle, la lignée de cellules P19 pourrait aussi être utilisée, bien que son emploi soit beaucoup moins courant. Il est tout de même clair que ce genre d'études ne permettrait encore pas de déterminer le rôle précis de ZPK, mais elle pourrait confirmer d'une autre façon l'importance de notre protéine kinase dans la différenciation cellulaire.

Pour rester dans la même catégorie d'expériences, si les résultats obtenus par l'étude de transfection mentionnée précédemment sont positifs, il serait également intéressant de répéter cette approche mais avec différents mutants de ZPK afin de confirmer que c'est bien l'activité de la protéine qui cause la différenciation cellulaire.

#### **4.5 Utilisation de l'anticorps pour la réalisation de divers expériences.**

Les anticorps sont des outils très importants en recherche lorsqu'on étudie une protéine. Ils permettent la réalisation d'une grande diversité d'expériences et celles-ci peuvent varier selon le type de protéines étudiées. Dans le cas de ZPK, il existe bien sûr plusieurs possibilités dont voici quelques exemples. Lorsqu'on cherche la fonction d'une protéine kinase, il devient très important de pouvoir identifier ses partenaires, c'est-à-dire les protéines avec qui elle interagit. La découverte de ceux-ci pourrait apporter de nouvelles informations quant au rôle de ZPK, surtout si l'un d'eux est déjà bien connu. Par exemple, si on découvrait que ZPK interagit avec des membres de la voie des JNKs, ceci viendrait appuyer davantage l'hypothèse de l'implication de notre protéine dans l'arrêt de la prolifération cellulaire.

Une des façons de trouver un ou des partenaires de ZPK serait de faire surexprimer notre protéine dans des cellules en culture, comme les NIH 3T3, et d'utiliser ensuite l'anti-ZPK pour procéder à une immunoprécipitation dans des conditions permettant de conserver les interactions protéine-protéine. Ainsi, si ZPK interagit avec une protéine dans les cellules NIH 3T3, celle-ci sera immunoprécipitée avec notre protéine. En effectuant par la suite une analyse

sur gel SDS-PAGE, on pourra déterminer le poids moléculaire de ce partenaire et tenter d'identifier celui-ci. Une autre approche possible serait de fixer l'anti-ZPK à une colonne d'affinité, et de faire passer des extraits cellulaires dans lesquelles on aurait fait surexprimé ZPK. En employant des conditions non-dénaturantes, ZPK pourrait possiblement rester accroché à la colonne ainsi que la ou les autres protéines avec qui il interagit. Après élution, on effectuerait une analyse sur gel SDS-PAGE qui permettrait de déterminer le poids moléculaire du ou des partenaires.

Finalement, l'anticorps pourrait aussi permettre de localiser ZPK dans la cellule en réalisant des expériences d'immunohistochimie. La localisation précise de notre protéine dans la cellule apporterait sûrement une information très importante pour la découverte de la fonction de ZPK.

## CONCLUSION

En résumé, les objectifs fixés pour ce projet de recherche étaient, dans un premier temps, de confirmer, par l'utilisation d'un modèle cellulaire, la relation possible entre l'expression du gène ZPK et le processus de différenciation. Cette première partie avait aussi pour but la détermination du niveau de régulation de l'expression du gène codant ZPK, soit transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Pour réaliser ces expériences, la lignée de cellules P19 a été utilisée. Les résultats obtenus ont permis de répondre aux objectifs établis précédemment. Ainsi, l'expression du gène ZPK est bel et bien relié à la différenciation cellulaire et la régulation de l'expression se situe au niveau transcriptionnelle.

Dans un deuxième temps, le projet de recherche avait pour objectif la production d'un anticorps anti-ZPK possédant une bonne spécificité. La méthode utilisée fut la production d'une protéine de fusion comprenant une portion de l'extrémité de ZPK étiquetté à une séquence de 6 histidines. La protéine de fusion purifiée a été mélangée à un adjuvant, le TiterMax, avant d'être injectée à des lapins. Les premiers résultats obtenus sur la caractérisation de l'anticorps produit ont démontré que celui-ci reconnaît très bien la protéine ZPK complète. De plus, d'autres expériences effectuées un peu plus tard dans le laboratoire ont montré que l'anti-ZPK possède une bonne spécificité. On peut donc dire que l'objectif de cette seconde partie a été atteint.

En conclusion, le projet de recherche effectué dans le cadre de mes études de deuxième cycle a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur l'expression du gène ZPK et sa régulation, en plus de fournir un nouvel outil de travail pour le laboratoire, soit un anticorps. La disponibilité de cet anti-ZPK ouvre la voie à la réalisation d'une série d'expériences ayant pour objectif de déterminer la fonction de cette nouvelle protéine kinase.



## ANNEXE

**Tableau 1 : Les acides aminés et leurs symboles.**

| ACIDES AMINÉS |     |                  | CODONS                  |
|---------------|-----|------------------|-------------------------|
| A             | Ala | Alanine          | GCA GCC GCG GCT         |
| C             | Cys | Cystéine         | TGC TGT                 |
| D             | Asp | Acide aspartique | GAC GAT                 |
| E             | Glu | Acide glutamique | GAA GAG                 |
| F             | Phe | Phénylalanine    | TTC TTT                 |
| G             | Gly | Glycine          | GGA GGC GGG GGT         |
| H             | His | Histidine        | CAC CAT                 |
| I             | Ile | Isoleucine       | ATA ATC ATT             |
| K             | Lys | Lysine           | AAA AAG                 |
| L             | Leu | Leucine          | TTA TTG CTA CTC CTG CTT |
| M             | Met | Méthionine       | ATG                     |
| N             | Asn | Asparagine       | AAC AAT                 |
| P             | Pro | Proline          | CCA CCC CCG CCT         |
| Q             | Gln | Glutamine        | CAA CAG                 |
| R             | Arg | Arginine         | AGA AGG CGA CGC CGG CGT |
| S             | Ser | Sérine           | AGC AGT TCA TCC TCG TCT |
| T             | Thr | Thréonine        | ACA ACC ACG ACT         |
| V             | Val | Valine           | GTA GTC GTG GTT         |
| W             | Trp | Tryptophane      | TGG                     |
| Y             | Tyr | Tyrosine         | TAC TAT                 |

## BIBLIOGRAPHIE

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., et WATSON, J.D. 1995. Biologie moléculaire de la cellule. Flammarion. France. 1270 p.

BEAUDOIN, J., NADEAU, A., BERGERON, P., GRONDIN, G., et BLOUIN, R. 1994. Identification of a novel putative protein kinase preferentially expressed in the brain and the pancreas. *Mol. Biol. Cell.* **5**, 150a.

BERGERON, P., DOUZIECH, M., DAIGLE, N., ET BLOUIN, R. 1997. Inhibition of cell growth by overexpression of the *ZPK* gene. *Biochem. Bioph. Res. Commun.* **231**, 153-155.

BLOUIN, R., BEAUDOIN, J., BERGERON, P., NADEAU, A., ET GRONDIN, G. 1996. Cell-specific expression of the *ZPK* gene in adult mouse tissues. *DNA and Cell Biol.* **15**, 631-642.

CANO, E., et MAHADEVAN, L.C. 1995. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *TIBS* **20**, 117-122.

CASANOVA, E., GARATE, C., OVALLE, S., CALVO, P., et CHINCHETRU, M.A. 1996. Identification of four splice variants of the mouse stress-activated protein kinase JNK/SAPK  $\alpha$ -isoform. *NeuroReport* **7**, 1320-1324.

COSO, O.A., CHIARIELLO, M., YU, J.C., TERAMOTO, H., CRESPO, P., XU, N., MIKI, T., et GUTKIND, J.S. 1995. The small GTP-binding protein Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-1146.

COWLEY, S., PATERSON, H., KEMP, P., et MARSHALL, C.J. 1994. Activation of MAP Kinase Kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **17**, 841-852.

DARNELL, J., LODISH, H., et BALTIMORE, D. 1993. Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck-Wesmael. Bruxelles. 1102 p.

DOROW, D., DEVEREUX, L., DIETZSCH, E., et DE KRETZER, T. 1993. Identification of a new family of human epithelial protein kinases containing two leucine/isoleucine-zipper domains. *Eur. J. Biochem.* **213**, 701-710.

DOROW, D., DEVEREUX, L., TU, G., PRICE, G., NICHOLL, J.K., et SUTHERLAND, G.R. 1995. Complete nucleotide sequence, expression, and chromosomal localisation of human mixed-lineage kinase 2. *Eur. J. Biochem.* **234**, 492-500.

EZOE, K., LEE, S.-T., STRUNK, K., et SPRITZ, R.A. 1994. PTK1, a novel protein kinase required for proliferation of human melanocytes. *Oncogene* **9**, 935-938.

FAN, G., MERRITT, S.E., KORTENJANN, M., SHAW, E., et HOLZMAN, L.B. 1996. Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46<sup>SAPK</sup> and p38<sup>mapk</sup> but not ERK2. *J. Biol. Chem.* **271**, 24788-24793.

GALLO, K.A., MARK, M.R., SCADDEN, D.T., WANG, Z., GU, Q., ET GODWOSKI, P.J. 1994. Identification and characterization of SPRK, a novel src-homology 3 domain-containing proline-rich kinase with serine/threonine kinase activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 15092-15100.

GOSSEN, M., BONIN, A.L., FREUNDLIEB, S., et BUJARD, H. 1994. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 516-520.

HANKS, S.K., et HUNTER, T. 1995. The eukaryotic protein kinase superfamily : kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576-596.

HANKS, S.K., QUINN, A.M., et HUNTER, T. 1988. The protein kinase family : conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-51.

HIRAI, S., IZAWA, M., OSADA, S., SPYROU, G., et OHNO, S. 1996. Activation of the JNK pathway by related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* **12**, 641-650.

HOLZMAN, L.B., MERRITT, S.E., et FAN, G. 1994. Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. **269**, *J. Biol. Chem.* 30808-30817.

HOWELL, B., AFAR, D., LEW, J., DOUVILLE, E., ICELY, P., GRAY, D., et BELL, J. 1991. STY, a tyrosine phosphorylating enzyme with sequence homology to serine/threonine kinase. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 568-572.

HUNDLE, B., McMAHON, T., DADGAR, J., et MESSING, R.O. 1995. Overexpression of  $\epsilon$ -protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **270**, 30134-30140.

ING, Y., LEUNG, I.W., HENG, H.H.Q., TSUI, L.-C., et LASSAM, N.J. 1994. MLK-3 : identification of a widely-expressed protein kinase bearing an SH3 and leucine zipper-basic region domain. *Oncogene* **9**, 1745-1750.

INO, H., ISHIZUKA, T., CHIBA, T., et TATIBANA, M. 1994. Expression of CDK5 (PSSALRE kinase), a neuronal cdc2-related protein kinase, in the mature and developing mouse central and peripheral nervous system. *Brain Research* **661**, 196-206.

- JOHNSON, G.L., et VAILLANCOURT, R.R. 1994. Sequential protein kinase reaction controlling cell growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**, 230-238.
- JONES-VILLENEUVE, E.M., McBURNEY, M.W., ROGERS, K.A., et KALNINS, V.I. 1982. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell Biol.* **94**, 253-262.
- MALARKEY, K., BELHAM, C.M., PAUL, A., GRAHAM, A., McLEES, A., et SCOTT, P.H. 1995. The regulation of tyrosine kinase signaling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **309**, 361-375.
- MARSHALL, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling : transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-185.
- MATA, M., MERRITT, S.E., FAN, G., YU, G.G., et HOLZMAN, L.B. 1996. Characterization of dual leucine zipper-bearing kinase, a mixed lineage kinase present in synaptic terminal whose phosphorylation state is regulated by membrane depolarization via calcineurin. *J. Biol. Chem.* **271**, 16888-16896.
- MAYERS, M.P., MURPHY, M.P., et LANDRETH, G. 1994. The dual-specificity CLK kinase induces neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* 6954-6961.
- MILLER, K., et RIZZINO, A. 1995. The function of inducible promoter systems in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **218**, 144-150.
- NADEAU, A., GRONDIN, G., et BLOUIN, R. 1997. In situ hybridization analysis of ZPK gene expression during murine embryogenesis. *Cytochem.* **45**, 107-118.
- NEPVEU, A., et MARCU, K.B. 1986. Intragenic pausing and anti-sens transcription within the murine c-myc locus. *EMBO J.* **5**, 2859-2865.
- PAWSON, T., et GISH, G.D. 1992. SH2 and SH3 domains : from structure to function. *Cell* **71**, 359-362.
- RANA, A., GALLO, K., GODOWSKI, P., HIRAI, S., OHNO, S., ZON, L., KYRIAKIS, J.M., et AVRUCH, J. 1996. The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated protein kinase activator, SEK-1. *J. Biol. Chem.* **271**, 19025-19028.
- REDDY, U.R., et PLEASURE, D. 1994. Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 613-620.



SEO, M., et NOGUCHI, K. 1995. Retinoic acid induces gene expression of fibroblast growth factor-9 during induction of neuronal differentiation of mouse embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS Letters*. **370**, 231-235.

SMITH, S.C., REUHL, K.R., CRAIG, J., et McBURNEY, M.W. 1987. The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* **131**, 74-84.

WAYS, D.K., POSEKANY, K., DE VENTE, J., GARRIS, T., CHEN, J., HOOKER, J., QIN, W., COOK, P., FLETCHER, D., et PARKER, P. 1994. Overexpression of protein kinase C- $\xi$  stimulates leukemic cell differentiation. *Cell Growth & Differ.* **5**, 1195-1203.

WEBSTER, M.K., GOYA, L., et FIRESTONE, G.L. 1993. Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 11482-11485.